



応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

オーファング蛋白質共役型レセプター蛋白質の1つとして、ヒトFRL1が知られている (J. Biol. Chem. 267(11), 7637-7643(1992))。FRL1のアゴニストとしては、これまでにバグデリア由来のfMLF、HIV由来のgp41あるいはgp120の部分ペプチド、アリオンの部分ペプチド、内因性の物質としてはAB42、Annexin Iの部分ペプチド、Acute phase protein、hCAP18、NADH dehydrogenaseなどの部分ペプチド、脂質であるリポキジンA4などが報告されている (Immunopharmacol. 2巻、1-13頁、2002年)。

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) は進行性痴呆および認知能力の失調を伴う神経変性疾患の代表的なものであるが、これまでに効果的な治療法は見出されていない。アルツハイマー病は高齢化社会を迎えつつある現在において最も重要な疾患の一つであることは言うまでもなくその治療薬の開発は医療経済的にも極めて大きな意義を有する。

最近、橋本らは、アルツハイマー病患者の後頭葉に病変が少ないことに着目して「デス・トラップ」法 (L. D'Adamio, Semin. Immunol., 9巻、17-23頁、1997年) により家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を導入した神経細胞の細胞死を抑制する遺伝子を後頭葉よりクローニングした (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98巻、6336-6341頁、2001年)。この遺伝子は、human (WO 01/21787) と名付けられた24残基からなるペプチドをコードしており、合成humaninペプチドは、家族性アルツハイマー病遺伝子を導入した神経細胞死を抑制したのみならず、アルツハイマー病の原因である可能性があると考えられているβアミロイド添加によって誘導される神経細胞死をも抑制した。humaninは細胞外に分泌され、神経細胞に作用して細胞死を抑制するものと考えられているが、その受容体は明らかにされていないかった。

AB42がFRL1のアゴニストであり、FRL1を介して走化性を示すこと、および、アルツハイマー病の特徴病変である老人斑にFRL1が集積していることが報告されている。これらのことより、FRL1とアルツハイマー病で見られる炎症反応との関連性が示唆されている (The Journal of Neuroscience, 2001, Vol. 21 RC123)。

AB42がFRL1を介してマクロファージ細胞内に取り込まれることにより、繊維素凝集 (アミロイド線沈着) を形成することも報告されている (The FASEB Journal, Vol. 15 November 2001, 2454-2462)。

さらに、オーファング蛋白質共役型レセプター蛋白質の1つとして、ヒトFRL2が知られている (Genomics 13 (2), 437-440 (1992))。

ヒトFRL2とfMLF (formyl-Met-Leu-Phe) のレセプターであるFRL1との相同性が大きいことが、ヒトFRL2はfMLFと反応しないことが報告されている。また、FRL2は単球に発現が認められたが、FRL1およびFRL1の発現が認められた好中球には発現が認められなかったことが報告されている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994 May 30;201(1):174-9)。

W-Petide (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH<sub>2</sub>) がFRL1および

PRL2のアミノ酸であり、FPR L2が単球で高発現していることが報告されている (J. Biol. Chem. 276(24), 21585-21593(2001))。

ヘリコバクターピロリ由来ペプチドHP (2-20) がFPR L2のアミノ酸であり、FPR L1/FPR L2を介して単球を活性化することが報告されている (J. Clin. Invest., 2001 Oct;108(8):1221-8)。

抗原提示細胞の一種である樹状細胞 (成熟型、未成熟型) に機能を保持したFPR L2が発現しており、樹状細胞のtrafficking (輸送) を制御しているのではないかと報告されている。 (J. Leukoc. Biol., 2002 Sep;72(3):598-607)。

10 ラット型humaninが神経保護活性を有することが記載されている (The FASEB Journal, Vol.16, August 2002, 1331-1333)。

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質 (すなわち、リガンド) との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質 (すなわち、リガンド) と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアミノ酸またはアミノ酸として、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、G蛋白質共役型レセプター-蛋白質の特異的リガンドを決定することは、医薬品開発の標的ともなりうるアミノ酸、アミノ酸を見出す際に、非常に重要な手段となる。

16 18 20 しかし、現時点でもなお、機能未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、G蛋白質共役型レセプターのリガンド探索および機能解明が切望されている。

25 G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質 (すなわち、リガンド) の探索、また、該レセプターに対するアミノ酸またはアミノ酸の探索に有用である。これら該レセプターに対するリガンド、アミノ酸またはアミノ酸などは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全や機能亢進に関連する疾患の予防・治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づき、生体での該

レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアミノ酸またはアミノ酸の投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内 (またはある特定の臓器) への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に適用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関連する疾患の予防・治療薬や診断薬に応用することもできる。

10 本発明は、humanin類似ペプチドとFPR L1またはFPR L2との結合性を変化させる化合物 (アミノ酸、アミノ酸) またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるhumanin類似ペプチドとFPR L1またはFPR L2との結合性を変化させる化合物 (アミノ酸、アミノ酸) またはその塩、およびhumanin類似ペプチドとFPR L1またはFPR L2との結合性を変化させる化合物 (アミノ酸、アミノ酸) を含有してなる医薬品などを提供することを目的とする。

#### 15 発明の開示

本発明者らは、上記の問題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、新規なhumanin類似ペプチドまたはその塩がFPR L1のリガンドであることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

25 (1) (1) 配列番号: 1 (ヒトFPR L1)、配列番号: 17 (ラットFPR L1)、配列番号: 19 (マウスFPR L2) または配列番号: 21 (ヒトFPR L2) で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター-蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および (2) humanin類似ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする該レセプター-蛋白質またはその塩とhumanin類似ペプチドま

たはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(2) humanin類似ペプチドが、

5 (1) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、または

(2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列中の連続する6～20個のアミノ酸からなるペプチドまたはその塩である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(3) humanin類似ペプチドが、

10 (1) a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列、b) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 配列

番号：6で表されるアミノ酸配列に1～10個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはe) これらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩、または

15 (2) a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、第1番目～21番目、もしくは第5番目～21番目のアミノ酸配列、b) 該アミノ酸配列中の1～6個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 該アミノ酸配列に1～6個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 該アミノ酸配列中の1～6個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、e) またはこれらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなり、アミノ酸の数が6～20個であるペプチド (ただし、配列番号：11または配列番号：12で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、第1番目～21番目または第5番目～21番目のアミノ酸配列からなるペプチドを除く) またはその塩である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

20 (4) humanin類似ペプチドが、

(1) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその

塩、または

(2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、第1番目～21番目、もしくは第5番目～21番目のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

5 (5) (1) 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および (2) humanin類似ペプチドを含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とhumanin類似ペプチドまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングキット、

10 (6) 上記 (1) 記載のスクリーニング方法または上記 (5) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩、

(7) アゴニストである上記 (6) 記載の化合物、

(8) アントゴニストである上記 (6) 記載の化合物、

20 (9) humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

25 (10) 上記 (7) 記載のアゴニストを含有してなる神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療剤、

(11) アルツハイマー病、パーキンソン病、クローン症、筋萎縮性側索硬化症、アミオノ病、クローンフェルトーヤコフ病、ハンチントン病、糖尿病性ニユーロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、

硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療剤である上記〔10〕記載の予防・治療剤、

（12）上記〔7〕記載のアミノストを含有してなる細胞死抑制剤、

- 〔13〕（1）配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白共役型シセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および（2）humanin類似ペプチドまたはその塩と該シセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該シセプター蛋白質またはその塩に対するアミノストまたはアプタミストのスクリーニング方法、

- （14）哺乳動物に対して、上記〔7〕記載のアミノストの有効量を投与することを特徴とする（i）神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療方法、（ii）アルツハイマー病、パーキンソン病、タウン症、筋萎縮性側索硬化症、フリオソ病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療方法または（iii）細胞死抑制方法、および

- （15）（i）神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療剤、（ii）アルツハイマー病、パーキンソン病、タウン症、筋萎縮性側索硬化症、フリオソ病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療剤または（iii）細胞死抑制剤を製造するための上記〔7〕記載のアミノストの使用を提供する。

さらに、本発明は、

- 〔16〕（i）配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白共役型シセプター蛋白質（以下、FPR L1/FPR L2と略記する）、その部分ペプチドまたはその塩と、humanin類似ペプチドまたはその塩とを接触させた場合と、（ii）FPR L1/

FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩と、humanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

- （17）（i）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩をFPR L1/FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、（ii）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物をFPR L1/FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩のFPR L1/FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

- （18）（i）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩をFPR L1/FPR L2を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物をFPR L1/FPR L2を含有する細胞に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

- （19）（i）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩をFPR L1/FPR L2を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、（ii）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物をFPR L1/FPR L2を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩の該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

- （20）（i）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩を、FPR L1/FPR L2をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2に接触させた場合と、（ii）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩のFPR L1/FPR L2に対す

10

る結合量を測定し、比較することを特徴とする上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(21) (i) FPR L1/FPR L2を活性化する化合物またはその塩をFPR L1/FPR L2を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) FPR L1/FPR L2を活性化する化合物またはその塩および試験化合物をFPR L1/FPR L2を含有する細胞に接触させた場合における、FPR L1/FPR L2を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(22) FPR L1/FPR L2を活性化する化合物またはその塩を、FPR L1/FPR L2をコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2に接触させた場合と、FPR L1/FPR L2を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2に接触させた場合における、FPR L1/FPR L2を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(23) FPR L1/FPR L2を活性化する化合物がhuman in類似ベクターである上記 (21) または (22) 記載のスクリーニング方法、

(24) FPR L1/FPR L2を含有する細胞またはその膜面分を含有することを特徴とする上記 (5) 記載のスクリーニングキット、および

(25) FPR L1/FPR L2をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2を含有することを特徴とする上記 (5) 記載のスクリーニングキット等を提供する。

25

#### 図面の簡単な説明

図1は各種濃度のhuman in類似ベクターHN3 (配列番号: 6) によるラット副腎髄質由来褐色細胞腫細胞PC12hに対するグルタミン酸脱羧細胞死抑制活性を示す。細胞の生存率は、グルタミン酸無添加区を100%とした

11

ときの比率によって表わした。\*はhuman in類似ベクターHN3無添加区に対して有意な ( $p < 0.05$ ) 差であることを示す。

図2は細胞内cAMP量によるFPR L1-GFP受容体発現させたCHO細胞に特異的なhuman in類似ベクター(HN3) のリガンド活性の用量依存性を調べた結果を示す。ホルスコリンで刺激しない状態(Bas aal) に対し、ホルスコリンを1  $\mu$ M添加(FSK)、および図中に表示の濃度( $\mu$ M)のHN3をホルスコリン存在下でインキュベーションし、細胞内cAMP量を比較した結果である。Bas aalはホルスコリン(FSK) およびリガンドを添加していない場合を示す。FSKはホルスコリンを添加した場合を示す。Li g and ( $\mu$ M) + FSKはHN3とホルスコリンを添加した場合を示す。Li g andの数字は添加したHN3の濃度( $\mu$ M)を示す。縦軸のcAMP (pmol/well) は細胞内cAMP量 (pmol/well) を示す。

図3は細胞内cAMP量によるFPR L1-GFP受容体を発現させていないCHO細胞(mock) に特異的なhuman in類似ベクター(HN3) のリガンド活性の用量依存性を調べた結果を示す。ホルスコリンで刺激しない状態(Bas aal) に対し、ホルスコリンを1  $\mu$ M添加(FSK)、および図中に表示の濃度( $\mu$ M)のhuman in類似ベクター(HN3) をホルスコリン存在下でインキュベーションし、細胞内cAMP量を比較した結果である。Bas aalはホルスコリン(FSK) およびリガンドを添加していない場合を示す。FSKはホルスコリンを添加した場合を示す。Li g and ( $\mu$ M) + FSKはHN3とホルスコリンを添加した場合を示す。縦軸の数字は添加したHN3の濃度( $\mu$ M)を示す。縦軸のcAMP (pmol/well) は細胞内cAMP量 (pmol/well) を示す。

図4は各レセプター蛋白質を発現するCHO細胞に各種リガンドを反応させた時の細胞内cAMP量を測定し、EC<sub>50</sub>値(nM) を求めた結果を示す。EC<sub>50</sub> valuesはEC<sub>50</sub>値を示す。Sampleは使用したリガンド試料を示す。HN3は配列番号: 6で表わされるアミノ酸配列からなるhuman in類似ベクター(HN3) を示す。W-peptideはTrrp-Lys-Tyr-Met-Val-dMet-NH<sub>2</sub> (配列番号: 31) を示す。

25

す。dMe tはD体のMe tを示す。β-Amyloid (1-42) はβ-アミロイド(1-42)を示す。hFPR1はヒト由来FPR Lを示す。hFPR L1はヒト由来FPR L1を示す。hFPR L2はヒト由来FPR L2を示す。mFPR L2はマウス由来FPR L2 (FPR L1)を示す。rFPR L1はラット由来FPR L1を示す。>100000は10000nM以上を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明で使用されるFPR L1は、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

本発明で使用されるFPR L2は、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

FPR L1またはFPR L2は、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ゾウ、ヒツジ、ウシ、サルなど) のあらゆる細胞 (例えば、脾細胞、神経細胞、グリブ細胞、腔臓β細胞、骨髄細胞、マサチューセツム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など) や血球系の細胞、またはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位 (例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、披散、尾状核、脳梁、黒質)、腎臓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例、大腸、小腸)、腸管、血管、心臓、胸腺、脾臓、頸下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、特に、脾臓、骨髄、腸管、単球、マ

クロマチンなどの免疫担当臓器と免疫担当細胞に由来する蛋白質であつてもよく、また合成蛋白質であつてもよい。

配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるFPR L1と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列からなるFPR L2と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; キヤップを許す; マトリクス=BLOSUM62; ギャップペナルティ=OFF) にて計算することができる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝

遮作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に従って行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、F P R L 1としては、a) 配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

F P R L 2としては、a) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらを組み合わ

せたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるF P R L 1またはF P R L 2は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するF P R L 1をはじめとするF P R L 1は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシル基（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>6-10</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-3</sub>アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるジバロイルオキシメチル基などが用いられる。

F P R L 1またはF P R L 2がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミドまたはエステル化されているものも本発明のF P R L 1またはF P R L 2に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、F P R L 1またはF P R L 2には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジン基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のF P R L 1の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来F P R L 1、配列番号：17で表わされるアミ



ノ酸配列からなるラット由来F P R L 1、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるマウス由来F P R L 2などが用いられる。このヒト由来F P R L 1は、J. Biol. Chem. 267(11), 7637-7643(1992)に記載されている公知の蛋白質である。マウス由来F P R L 2は、J. Immunol. 169, 3363-3369 (2002)に記載されている公知の蛋白質である。

本発明のF P R L 2の具体例としては、例えば、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来F P R L 2などが用いられる。このヒト由来F P R L 2は、Genomics 13 (2), 437-440 (1992)に記載されている公知の蛋白質である。

F P R L 1またはF P R L 2の部分ペプチド(以下、本発明の部分ペプチドと略記する場合がある)としては、上記したF P R L 1またはF P R L 2の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、F P R L 1またはF P R L 2の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を有するF P R L 1の部分ペプチドまたは配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を有するF P R L 2の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性 (Hydrophilic) 部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性 (Hydrophobic) 部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムANCB1 BLAST (National Center for Biotechnology I

information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; キヤップを許す; マトリクス=BLOSUM62; ワイルクリング=OFF) にて計算することができる。

ここで、「実質的に同質のレセプター活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質のレセプター活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が付け加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1~5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシ基(—COOH)、カルボキシレート(—COO<sup>-</sup>)、アミド(—CONH<sub>2</sub>)またはエステル(—COOR)の何れであってもよい。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシ基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシ基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。

この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記したF P R L 1またはF P R L 2と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のF P R L 1、F P R L 2またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、

塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、辛酸、デロビオン酸、マール酸、マリン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のF P R L 1またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自己公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のF P R L 1をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてすることにより精製分離することができる。

本発明のF P R L 1もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ペンズヒドリアルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルペンズヒドリアルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自己公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エ

チル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N'-ジメチルホルムアミド、N, N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、デロビオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質縮合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20〜50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5〜4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことな

り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシヤーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-2、B1-2、アザベンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホルムイルオキシカルボニルなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシヤーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクタチル、2-アザベンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジル

5 エステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル(c)、フェニシルエステル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーグトキシカルボ  
 ニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。  
 セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護する  
 ことができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの  
 低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカル  
 ボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられ  
 る。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド  
 ロピニル基、ヒンナチル基などである。

10 テロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz、Cl、  
 Bz、2-ニトロベンジル、Bz、ターシャリーグナルなどが用いられ  
 る。

15 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキ  
 ジ-2、3、6-トリメチルベンゼンスルホン、DNP、ベンジルオキシメ  
 チル、Bum、Boc、Tbt、Fmocなどが用いられる。

20 原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無  
 水物、アジド、活性エステル (アルコール (例えば、ベンタクロロフェノール、  
 2、4、5-トリクロロフェノール、2、4-ジニトロフェノール、シアノメ  
 チルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスチミ  
 ド、N-ヒドロキシタルイミド、HOBt) とのエステル) などが用いられ  
 る。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸ア  
 ミドが用いられる。

25 保護基の除去 (脱離) 方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素  
 などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水酢化水素、  
 メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるい  
 はこれらの混合液などによる酸処理や、ジメチルホルムアミン、トリエ  
 チルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニ  
 ア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、

一般に約-20~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、  
 アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレソール、パラクレソール、  
 ジメチルスルフィド、1、4-ジオキサチオール、1、2-エタソジチオール  
 などのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダ  
 ゾール保護基として用いられる2、4-ジニトロフェニル基はチオフェノール  
 5 処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホル  
 ミル基は上記の1、2-エタソジチオール、1、4-ジオキサチオールなどの  
 存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニ  
 アなどによるアルカリ処理によっても除去される。

10 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保  
 護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段  
 から適宜選択しうる。

15 蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端  
 アミノ酸のα-カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にベン  
 チド (蛋白質) 鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ベンチド鎖のN末端のα-  
 アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシ基の保護基のみ  
 を除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で精  
 20 合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた  
 保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗  
 蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精  
 製し、主要画分を凍結乾燥することによって所望の蛋白質のアミド体を得ること  
 30 ができる。

25 蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα-カル  
 ボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミドエステルとした後、蛋白  
 質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明のFRL1の部分ペプチドまたはその塩は、自己公知のペプチドの  
 合成法に従って、あるいは本発明のFRL1を適当なペプチダーゼで切断す  
 ることによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、  
 固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のFRL

L1を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを結合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下のa)～e)に記載された方法が挙げられる。

a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

b) Schroeder および Luecke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

d) 矢島治明 および 神原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

e) 矢島治明監修、医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。本発明の F P R L 2、その部分ペプチドまたはその塩も上記と同様の方法で製造することができる。

本発明の F P R L 1 または F P R L 2 をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明の F P R L 1 または F P R L 2 をコードする塩基配列 (DNA または RNA、好ましくは DNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明の F P R L 1 または F P R L 2 をコードする DNA、mRNA 等の RNA であり、二本鎖であつても、一本鎖であつてもよい。二本鎖の場合は、二本鎖 DNA、二本鎖 RNA または DNA:RNA のハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (すなわち、コード鎖) であつても、アンチセンス鎖 (すなわち、非コード鎖) であつてもよい。

本発明の F P R L 1 または F P R L 2 をコードするポリヌクレオチドを用い

て、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明の F P R L 1 または F P R L 2 の mRNA を定量することができる。

本発明の F P R L 1 または F P R L 2 をコードする DNA としては、ゲノム DNA、クノム DNA ライブラリー、上記した細胞・組織由来の cDNA、上記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであつてもよい。また、上記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RTPCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の F P R L 1 をコードする DNA としては、例えば、配列番号: 2、配列番号: 18 または配列番号: 20 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号: 2 で表わされる塩基配列とハイストリレンジン条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号: 1、配列番号: 17 または配列番号: 19 で表わされるアミノ酸配列からなる F P R L 1 と実質的に同質の活性 (例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など) を有するレセプター蛋白質をコードする DNA であれば何れのものでもよい。

配列番号: 2、配列番号: 18 または配列番号: 20 で表わされる塩基配列とハイブリダイズできる DNA としては、例えば、配列番号: 2、配列番号: 18 または配列番号: 20 で表わされる塩基配列と約 85% 以上、好ましくは約 90% 以上、より好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などを用いられる。

本発明の F P R L 2 をコードする DNA としては、例えば、配列番号: 22 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号: 22 で表わされる塩基配列とハイストリレンジン条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号: 21 で表わされるアミノ酸配列からなる F P R L 2 と実質的に同質の活性 (例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など) を有するレセプター蛋白質をコードする DNA であれば何れのものでもよい。

配列番号：22で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：22で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAなどが用いられる。

5 塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; ハイブリッド=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

10 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリシジェントな条件に従って行うことができる。

15 該ハイストリシジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

20 より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるヒトFPR L1をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。配列番号：17で表わされるアミノ酸配列からなるラットFPR L1をコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるマウスFPR L2をコードするDNAとしては、配列番号：20で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。配列番号：21で表わされるアミノ酸配列からなるヒトFPR L2をコードするDNAとしては、配列番号：22で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられ

る。

本発明のFPR L1またはFPR L2をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ベクタをコードするDNAを包含するだけではなく、

5 RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、FPR L1遺伝子またはFPR L2遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド (核酸) を、クロン化し、あるいは決定されたFPR L1またはFPR L2をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド (核酸) は、FPR L1遺伝子またはFPR L2遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはFPR L1関連RNAまたはFPR L2関連RNAとの相互作用を介してFPR L1遺伝子またはFPR L2遺伝子の発現を調節・制御することができる。FPR L1関連RNAまたはFPR L2関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびFPR L1関連RNAまたはFPR L2

15 関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でFPR L1遺伝子またはFPR L2遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とベクタ (蛋白質) との間で「対応する」とは、ヌクレオチド (核酸) の配列またはその相補体から誘導される指令にあるベクタ

20 ド (蛋白質) のアミノ酸を通常指している。FPR L1遺伝子またはFPR L2遺伝子の5' 端ヘアピンループ、5' 端6-ベースペア・リベート、5' 端非翻訳領域、ポリベクタド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端ポリシンドローム領域、および3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、FPR L1遺伝子またはFPR L2遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

25 目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすること

ができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるとい  
うことができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リ  
ボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有し  
ているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシド  
であるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有  
するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核  
酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマ  
ーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許  
容する配座をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2  
本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA：R  
NAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または  
非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば  
当該分野で知られた標識のあるもの、キヤップの付いたもの、メチル化された  
もの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレ  
オチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、  
ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、  
電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホ  
ロチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアー  
ゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーリーリジンな  
ど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、  
イソターカルメント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、  
キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属  
など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つ  
もの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であつてもよい。ここで「ヌクレオ  
シド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基  
を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを  
含んでいてよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、  
アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むもの  
であつてよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた

糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂  
肪基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変  
換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あ  
るいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例と  
しては核酸の硫黄誘導体やチオホスファート誘導体、そしてポリヌクレオシド  
アミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のもが挙げられるが、そ  
れに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で  
好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定な  
ものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス  
鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチ  
センス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al.,  
Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke  
et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに  
開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、  
結合を含有して良く、リボゾーム、ミクロナフェアのような特殊な形態で  
供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられ  
ることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格  
の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との  
相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホス  
ホリピド、コレステロールなど）といった親水性のものが挙げられる。付加す  
るに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステ  
リルクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸  
の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオ  
シド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の3'  
' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキヤップ用の基で、エキソヌクレア  
ーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げ

られる。こうしたキヤップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アッセイの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型シグナル蛋白質の生体内や生体外の調節系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明のFRL1の部分ベクタをコードするDNAとしては、上記した本発明のFRL1の部分ベクタをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミッドいずれであってよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のFRL1の部分ベクタをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列とハイストリジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるFRL1と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するシグナル蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有す

るDNAなどが用いられる。

本発明のFRL2の部分ベクタをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：22で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：22で表わされる塩基配列とハイストリジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列からなるFRL2と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するシグナル蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：22で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：22で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件(期待値=10; キヤップを許す; ファイルロング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3)にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリジェントな条件に従って行うことができる。

該ハイストリジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

本発明のFRL1またはその部分ベクタ(以下、FRL1と略記する

場合がある) または本発明の F P R L 2 またはその部分ベクター (以下、F P R L 2 と略記する場合がある) を完全にコードする DNA のクローニングの手段としては、本発明の F P R L 1 または F P R L 2 の部分塩基配列を有する合成 DNA アライマーを用いて PCR 法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ DNA を本発明の F P R L 1 または F P R L 2 の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNA の塩基配列の変換は、PCR や公知のキット、例えば、Mutan™-K (宝酒造 (株) ) などを用いて、ODA-LA PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法などの公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された F P R L 1 または F P R L 2 をコードする DNA は目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該 DNA はその 5' 末端側に翻訳開始コドンとしての ATG を有し、また 3' 末端側には翻訳終了コドンとしての TAA、TGA または TAG を有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終了コドンは、適当な合成 DNA アダプターを用いて付加することもできる。

本発明の F P R L 1 または F P R L 2 の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明の F P R L 1 または F P R L 2 をコードする DNA から目的とする DNA 断片を切り出し、(ロ) 該 DNA 断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH

i5)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ククジニウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRec/CMV、pRec/RSV、pCDNA1/Neo などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、iPpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン (以下、SV40ori と略称する場合がある) などを含んでいるものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、dhfr と略称する場合がある) 遺伝子 (メソレキセート (MTX) 耐性)、アンピシリン耐性遺伝子 (以下、Amp<sup>r</sup> と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、Neo<sup>r</sup> と略称する場合がある、G418耐性) 等が挙げられる。特に、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞を用いて dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチャミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA



・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インジュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インテグラーゼロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のF<sub>1</sub> PRL1またはF<sub>1</sub> PRL2をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシエリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシエリヒア属菌の具体例としては、エシエリヒ・コリ (*Escherichia coli*・  
) K12・DH1 [プロシエジングズ・オフ・ザ・ナショナル・アカデミー・  
オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U  
S A) , 60巻, 160 (1968)] , JM103 [ヌクライック・アジツズ  
・リサーチ (Nucleic Acids Research) , 9巻, 309 (1981)] , JA2  
21 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular  
Biology) , 120巻, 517 (1978)] , HB101 [ジャーナル・オブ・  
モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)] , C600 [ジェ  
ネティクス (Genetics) , 39巻, 440 (1954)] などが用いられる。

20 バチルス風菌としては、例えば、バチルス・スバチルス (*Bacillus subtilis*) MI 114 [ジャーナル, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (*Journal of Biochemistry*), 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サツカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シンサツカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などを用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがA<sub>c</sub>NPVの場合は、夜盗蛾の幼虫

由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; S f 細胞)、Trichoplusia ni の中腸由来の MG1 細胞、Trichoplusia ni の卵由来の high five<sup>TM</sup> 細胞、Nemastera brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウ イルスが BmNPV の場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL 1711)、S f 2.1 細胞 (以上: Vaughn, J.L. ら、イン・ザイボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる（前田ら、ネイチヤー (Nature) , 315巻, 592(1985)）。

10. 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記)、マウスL細胞、マウスA17-20、マウスミエローマ細胞、ラットGCH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

15 エシエリヒア風菌を形質転換するには、例えば、プロシーエンダス・オファザ・ナシヨナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユエエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

20 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メツズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、アロシー・ジンダズ・オフ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユース・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、ハイオクテノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行

なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験マニュアル、263-267(1995)(秀潤社発行)、ウイルスロジー(Virology)、52巻、456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

- 6 このようにして、F P R L 1またはF P R L 2をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

- 10 宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、シロ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーチー・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。

- 15 エシエリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地(ミラー(Miller)、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics)、431-433、Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

- 20 宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 25 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バーホルダー(Burkholder)最小培地(Bostian, K. L.ら、プロシージンダス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシス・オブ・ザ・ユー

- 6 エスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、77巻、4505(1980)]や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地(Bitter, G. A.ら、プロシージンダス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシス・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、81巻、5330(1984))が挙げられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好ましい。培養は通常約20〜35℃で約24〜72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 10 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium(Grace, T. C. C., ナイチヤー(Nature)、195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2〜6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3〜5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 15 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5〜20%の胎児牛血清を含むMEM培地(サイエンス(Science)、122巻、501(1952))、DMEF培地(ウイルスロジー(Virology)、8巻、396(1959))、RPMI 1640培地(ジャーナル・オブ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association)199巻、519(1967))、199培地(プロシージンダス・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・バイオロジカル・メデアスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine)、73巻、1(1950))などが用いられる。pHは約6〜8であるのが好ましい。培養は通常約30〜40℃で約15〜60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 20 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のF P R L 1またはF P R L 2を生成せしめることができる。

- 25 上記培養物から本発明のF P R L 1またはF P R L 2を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のF P R L 1またはF P R L 2を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リソチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離や過によりF P R L 1またはF P R

5 L2の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸ジアジジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にF P R L 1またはF P R L 2が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

10 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるF P R L 1またはF P R L 2の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

15 かくして得られるF P R L 1またはF P R L 2が逆離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、逆離体または他の塩に変換することができる。

20 なお、粗換え体が産生するF P R L 1またはF P R L 2を、精製前または精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

25 かくして生成する本発明のF P R L 1またはF P R L 2の活性は、標識したリガンド(humanin類似ペプチド)との結合実験および特異抗体を用いたエンザイムアッセイなどにより測定することができる。

本発明のF P R L 1またはF P R L 2のリガンドはhumanin類似ペプチドまたはその塩である。

humanin類似ペプチドとしては、配列番号：6で表されるアミノ酸配

列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド(以下、humanin類似ペプチドと略記する)などが用いられる。

humanin類似ペプチドは、ヒトや非ヒト温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ゾウ、ヒツジ、ウシ、サル等)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓B細胞、骨髄細胞、メサネキウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、腎臓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、嚢丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋等)に由来するポリペプチドであってもよく、粗換えポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

15 「実質的に同一」とはhumanin類似ペプチドの活性、例えば、細胞死抑制作用(例、各種疾患に伴う細胞死に対する抑制作用)、細胞生存維持作用、または神経変性疾患、癌、免疫疾患、感染症、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患等の予防・治療活性(作用)など、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入が、ポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさない限り、当該置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたポリペプチドは、当該置換、欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一である。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。

25 非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあ

げられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、スチレン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

5 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、該アミノ酸配列を含有するポリペプチドが、配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるhumanin類似ペプチドと実質的に同一の活性（性質）を有する限り、特に限定されるものではなく、例えば配列番号：6で表されるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約85%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。

10 アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；アムタリソグ=OFF）にて計算することができる。

20 上記の実質的に同質の活性（性質）としては、例えば、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有するhumanin類似ペプチドの有する細胞死抑制作用（例、各種疾患に伴う細胞死に対する抑制作用）、細胞生存維持作用、または神経変性疾患、癌、免疫疾患、感染症、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患等の予防・治療活性（作用）などが定性的に同質であることを示す。

25 また、配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するhumanin類似ペプチドとしてより具体的には、例えば、a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～10個程度、好ましくは1～6個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～10個程度、好ましくは1～6個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～5個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなるポリペプチドなども含まれるが、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15または配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは含まれない。

6 上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

10 具体的には、humanin類似ペプチドとしては、配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドなどが用いられる。

15 humanin類似ペプチドは、上記したポリペプチドの部分ペプチドであってもよい。humanin類似ペプチドの部分ペプチドとしては、前記したhumanin類似ペプチドの部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、humanin類似ペプチドと実質的に同質の活性（「実質的に同質の活性」は上記と同意義を示す）ものなどが好ましく用いられる。

humanin類似ペプチドの部分ペプチドとしてより具体的には、前記した配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドの部分ペプチドなどが挙げられ、好ましくは前記した配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列中の連続する6～20個程度、好ましくは6～15個程度、より好ましくは6～10個程度のアミノ酸配列からなる部分ペプチドなどが用いられる。

20 「実質的に同一」とは、上記のhumanin類似ペプチドの説明における「実質的に同一」と同意義を示す。

25 また、humanin類似ペプチドの部分ペプチドとしてより具体的には、例えば、a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の6～20個程度、好ましくは6～15個程度、より好ましくは6～10個程度のアミノ酸配列からなるペプチド、またはb) 該アミノ酸配列中の1または2個以上（例、1～6個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはc) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～5個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドなども含まれるが、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15または配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは含まれない。

程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 該アミノ酸配列に1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 該アミノ酸配列中の1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはe) それらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなる部分ペプチドなども含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。ただし、上記の置換に関しては、配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第3、12、14、15、16または24番目のアミノ酸の置換は含まれない。

humanin類似ペプチドの部分ペプチドの具体例として、例えば、a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、第1番目～21番目、または第5番目～21番目のアミノ酸配列、またはb) 該アミノ酸配列中の1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 該アミノ酸配列に1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 該アミノ酸配列中の1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはe) それらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなり、アミノ酸の数が6～20個程度、好ましくは6～15個程度、より好ましくは6～10個程度である部分ペプチドなどが挙げられる。ただし、上記の置換に関しては、配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第3、12、14、15、16または24番目のアミノ酸の置換は含まれない。

humanin類似ペプチドの部分ペプチドのより好ましい具体例として、例えば、配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目(配列番号：9)、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、

第1番目～21番目、または第5番目～21番目のアミノ酸配列からなるペプチドなどが挙げられる。

また、humanin類似ペプチドまたはその部分ペプチドには、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

さらに、humanin類似ペプチドは、それぞれ単量体の他に、2量体、3量体、4量体などとして存在していてもよく、具体的には、humanin類似ペプチド同士で2量体を形成する場合、本発明の部分ペプチド同士で2量体を形成する場合、humanin類似ペプチドと本発明の部分ペプチドとで2量体を形成する場合などが挙げられる。

さらに、humanin類似ペプチドまたはその部分ペプチド(以下、humanin類似ペプチドと略記する)には、おのおののN末端またはC末端などにエビトープ(抗体認識部位)となりうる任意の外來ペプチド配列(例えば、FLAG、Hisタグ、HAタグ、HSVタグなど)を有しているものも含まれる。

humanin類似ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとするhumanin類似ペプチドは、C末端がカルボキシル基( $-\text{COOH}$ )、カルボキシレート( $-\text{COO}^-$ )、アミド( $-\text{CONH}_2$ )またはエステル( $-\text{COOR}$ )であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチル等の $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル等の $\text{C}_{5-6}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、n-オクチル等の $\text{C}_{8-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェニエチル等のフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチル等の $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基等の $\text{C}_{1-14}$ アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基等が用いられる。

humanin類似ペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボ

キシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本願明細書におけるhumanin類似ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が用いられる。

さらに、humanin類似ペプチドには、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基等のC<sub>1</sub>-アルカノイル等のC<sub>1-6</sub>-アシル基等)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基等のC<sub>1-6</sub>-アルカノイル基等のC<sub>1-6</sub>-アシル基等)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ポリペプチド等の複合ポリペプチド等も含まれる。

humanin類似ペプチドまたはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、フタル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リント酸、樟酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられる。

以下、明細書では、humanin類似ペプチド、その部分ペプチドまたはその塩をhumanin類似ペプチドと略記する。

humanin類似ペプチドは、前述したヒトや非ヒト温血動物の細胞または組織から公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するhumanin類似ペプチドをコードするポリペプチド(DNA等)を含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸等で抽出を行ない、得られ

た抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製分離することができる。

humanin類似ペプチドまたはそのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルアミン樹脂、アセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル)-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂等をあげることができる。このような樹脂を用い、α-アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のhumanin類似ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等が用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBT、HOBT)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対応する酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOBTエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等の酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノール等のアルコール類、ジメチルスルホキ

シド等のスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類あるいはこれらの適宜の混合物等が用いられる。反応温度はポリベンジド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20 \sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 $1.5 \sim 4$ 倍過剰で用いられる。ニシヒロシン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、 $\text{Z}$ 、 $\text{Boc}$ 、 $t$ -ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、 $4$ -メトキシベンジルオキシカルボニル、 $\text{C1-Z}$ 、 $\text{Br-Z}$ 、 $\alpha$ -ダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、 $2$ -ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、 $\text{Fmoc}$ 等が用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化 (例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、 $t$ -ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクタチル、 $2$ -アダマンチル等の直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化 (例えば、ベンジルエステル、 $4$ -ニトロベンジルエステル、 $4$ -メトキシベンジルエステル、 $4$ -クロロベンジルエステル、 $p$ -ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジロキシカルボニルヒドラジド化、 $t$ -ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化等によって保護することができる。

セリソの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基等の低級 ( $\text{C}_{1-6}$ ) アルカノイル基、ベンゾイル基等のアロイル基、ベンジロキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭酸から誘導される基等が用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド

ロピラニル基、 $t$ -ブチル基等である。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、 $\text{Bz1}$ 、 $\text{C1}$ 、 $2$ - $\text{Bz1}$ 、 $2$ -ニトロベンジル、 $\text{Br-Z}$ 、 $t$ -ブチル等が用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、 $\text{Tos}$ 、 $4$ -メトキシ- $2$ 、 $3$ 、 $6$ -トリメチルベンゼンスルホニル、 $\text{DNP}$ 、ベンジロキシメチル、 $\text{Bum}$ 、 $\text{Boc}$ 、 $\text{Trt}$ 、 $\text{Fmoc}$ 等が用いられる。

原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル (アルコール (例えば、ベンタクロロフェノール、 $2$ 、 $4$ 、 $5$ -トリクロロフェノール、 $2$ 、 $4$ -ジニトロフェノール、ジアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、 $\text{HONB}$ 、 $\text{N}$ -ヒドロキシアジド、 $\text{N}$ -ヒドロキシフタルイミド、 $\text{HOBT}$ ) とのエステル) 等が用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去 (脱離) 方法としては、例えば、 $\text{Pd}$ -黒あるいは $\text{Pd}$ -炭素等の触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液等による酸処理や、ジソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジン等による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元等も用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレノール、パラクレノール、ジメチルスルフィド、 $1,4$ -ジオキサンジオール、 $1$ 、 $2$ -エタノジオール等のようなカチオン捕獲剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる $2$ 、 $4$ -ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンインドル保護基として用いられるホルミル基は上記の $1$ 、 $2$ -エタノジオール、 $1$ 、 $4$ -ジオキサンジオール等の存在下での酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニア等によるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保

保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化等は公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

humanin類似ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(ポリペプチド)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶液中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができ。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要成分を凍結乾燥することによって所望の類似ペプチドのアミド体を得ることができる。

humanin類似ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合してアミドエステルとした後、humaninのアミド体と同様にして、所望の類似ペプチドのエステル体を得ることができる。

humanin類似ペプチドは、公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、humaninを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法などが挙げられる。

25 ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti, ペプチド・ジンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)。

②SchröderおよびLuebeck, ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)。

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)。

④矢島浩明 および梅原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)、および

⑤矢島浩明監修、統医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店。

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶液抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶等を組み合わせて本発明のポリペプチド、本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

humanin類似ペプチドをコードするポリヌクレオチド(以下、これらを総称して、本発明のポリヌクレオチドと称する場合がある)としては、前述したhumaninをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)。該ポリヌクレオチドとしては、humanin類似ペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

humanin類似ペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、前記した細胞または組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等いずれであってもよい。また、前記した細胞または組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse

25 Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

humanin類似ペプチドをコードするDNAとして、具体的には、配列番号:5で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどが挙げられる。



配列番号：5で表される塩基配列とハイストリンゼントな条件下でハイブリダイズできるDNAもhumanin類似ペプチドをコードするDNAとして挙げる事ができ、例えば、配列番号：5で表される塩基配列と約80%以上、好ましくは約85%以上、さらに好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA等が用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; キヤップを許す; ファルタリング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンゼントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンゼントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。

配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるhumanin類似ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：5で表される塩基配列からなるDNA等が挙げられる。

humanin類似ペプチドの部分ペプチドをコードするDNAとしては、humanin類似ペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよい。具体例には、配列番号：9で表されるアミノ酸配列からなる部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：10で表される塩基配列からなるDNAなどが挙げられる。

humanin類似ペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手

段としては、humanin類似ペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有する合成DNAライナーを用いてPCR法によってゲノムDNAやcDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNA (ライブラリー) をhumaninの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いてラジオアイソトープや酵素で標識したもの (DNAプローブ) とのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express kit (宝酒造 (株))、Mutan<sup>TM</sup>-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法やcupped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローニングされたhumanin類似ペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有しているもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

humanin類似ペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) humanin類似ペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、ヌクレオチド等のバクテリオファージ、レトロウイルス、ククシニアウイルス、バキュロウイルス等の動物ウイルス等の他、pA1-11、pXT1、

PRC/CMV、PRC/RSV、pCDNA1/Neo等が用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、β-アクトニン等が挙げられる。

これらのうち、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、SRαプロモーター等を用いるのが好ましい。宿主がエシエリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーター等が、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター等が好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン (以下、SV40oriと略称する場合がある) 等を含んでいるものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、dhfrと略称する場合がある) 遺伝子 (メソトレキセート (MTX) 耐性)、アミノシリン耐性遺伝子 (以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、Geneticin耐性) 等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チヤイニースヘムスター細胞を用いて dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、組換え体細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシエリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列等が、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サチリシン・シグナル配列等が、宿主が酵

母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列等、宿主が動物細胞である場合には、インジュリン・シグナル配列、α-インテグロエロシ・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列等がそれぞれ利用できる。

このようにして構築された類似ペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含むベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシエリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞等が用いられる。

エシエリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 (プロシージングス・オプ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)), JM103 (ヌクイレック・アジックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)), JA221 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)), HB101 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)), C600 (ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)) 等が用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 (ジーン, 24巻, 255(1983)), 207-21 (ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)) 等が用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>+</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シンサッカロマイセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) KM71等が用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell: Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のIlhGh Five<sup>+</sup>細胞、*Manestra*

- brassicae由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞等が用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、カイコ由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; Bm N細胞) 等が用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、*In Vivo*), 13, 213-217, (1977) 等が用いられる。

- 5 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が用いられる (前田ら、*ネイチャー* (Nature), 315巻, 592(1985))。

- 10 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記),  $\alpha$ ウスL細胞,  $\alpha$ ウスA1T-20,  $\alpha$ ウスミエロー $\alpha$ 細胞, ラットGH3細胞, ヒトFL細胞等が用いられる。

- 15 エシエリヒア属菌を形質転換するには、例えば、*プロシージン*・オゾ・ザ・ナショナル・アカデミー・オゾ・サイエンス・オゾ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)や*ジン* (Gene), 17巻, 107(1982)等に記載の方法に従って行なうことができる。

- 20 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アソシエーテッド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)等に記載の方法に従って行なうことができる。

- 25 酵母を形質転換するには、例えば、*メソジック・エンザイモロジー* (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、*プロシージン*・オゾ・ザ・ナショナル・アカデミー・オゾ・サイエンス・オゾ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)等に記載の方法に従って行なうことができる。

- 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、*バイオテクノロジー* (BioTechnology), 6, 47-55(1988)等に記載の方法に従って行なうことができる。

- 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験ノ

- ロトコール, 263-267(1995) (秀潤社発行)、*ウイルスロジー* (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

- このようにして、ポリベクターをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

- 6 宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、シロ糖等、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コブンスチアーズ・リカー、ペプトン、カゼイン、酵母エキス、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液等の無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等が挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子等を添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

- 15 エシエリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 (ミラー (Miller), *ジャーナル・オゾ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス* (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率的に働かせるために、例えば、3 $\beta$ -インドールアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

- 20 宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 25 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、*バークホルダー* (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L.ら、*プロシージン*・オゾ・ザ・ナショナル・アカデミー・オゾ・サイエンス・オゾ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)) や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 (Bitter, G. A.ら、*プロシージン*

・オプ・ザ・ナショナル・アカデミー・オプ・サイエンス・オプ・ザ・ユ  
ーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)  
 ) が挙げられる。培地の pH は約 5〜8 に調整するのが好ましい。培養は通常  
 約 20〜35℃ で約 24〜72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。  
 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、  
 Grace's Insect Medium (Grace, I. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)  
 ) に非動化した 10% フラジ血清等の添加物を適宜加えたもの等が用いられる。  
 培地の pH は約 6.2〜6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃  
 で約 3〜5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約  
 5〜20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 (サイエンス (Science), 122巻  
 , 501 (1952)), DMEM 培地 (サイロロジー (Virology), 8巻, 3  
 96 (1959)), RPMI 1640 培地 (ジャーナル・オプ・ザ・アメリカ  
 ン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical  
 Association) 199巻, 519 (1967)), 199 培地 (プロシーディング  
 オフ・ザ・ソサイエティ・オブ・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding  
 of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)) 等  
 が用いられる。pH は約 6〜8 であるのが好ましい。培養は通常約 30〜40  
 ℃ で約 15〜60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外 (好ましくは  
 細胞外) に humanin 類似ペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から humanin 類似ペプチドを分離精製するには、例えば、  
 下記の方法により行なうことができる。

humanin 類似ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際して  
 は、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸  
 濁し、超音波、リソチームおよび/または凍結融解等によって菌体あるいは細  
 胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により humanin 類似ペプチドの粗抽  
 出液を得る方法等が適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジン等の  
 蛋白質変性剤や、トリトン X-100™ 等の界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中に humanin 類似ペプチドが分泌される場合には、培養終了後、  
 公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる human  
 in 類似ペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なう  
 ことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法等の  
 溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-  
 リアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、イ  
 オン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、フラインイー  
 ロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグ  
 ラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を  
 利用する方法等が用いられる。

かくして得られる humanin 類似ペプチドが遊離体で得られた場合には、  
 公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に  
 塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体ま  
 たは他の塩に変換することができる。

なお、粗換え体が生産する humanin 類似ペプチドを、精製前または精  
 製後に適当な蛋白質修飾酵素または蛋白質分解酵素等を用いることにより、  
 任意に修飾を加えたり、humanin 類似ペプチドを部分的に除去すること  
 もできる。これらの酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、ア  
 ルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼ等が用い  
 られる。

かくして生成する humanin 類似ペプチドの存在は、特異抗体を用いた  
 エンザイムイムノアッセイやウエスタンブロット解析等により測定すること  
 ができる。

また、上述のとおり、humanin 類似ペプチドの N 末端または C 末端な  
 どにエピトープ (抗体認識部位) となりうる任意の外來ペプチド配列 (例えば、  
 FLAG, HIS タグ, myc タグ, HA タグ, HSV タグなど) を融合させ、  
 該ペプチド配列を認識する抗体を用いて、化学発光等を検出することにより、  
 humanin 類似ペプチドの存在を測定することも可能である。

humanin類似ペプチドは細胞死抑制作用、細胞生存維持作用などを有している。humanin類似ペプチドと受容体である本発明のFPR L1またはFPR L2は以下の用途を有している。

- すなわち、本発明は、本発明のFPR L1またはFPR L2とhumanin類似ペプチドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩（アミノ酸、アミノ酸塩など）のスクリーニング方法、および本発明のFPR L1またはFPR L2とhumanin類似ペプチドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬を提供する。
- 本発明のFPR L1またはFPR L2を用いるか、または相換え型FPR L1またはFPR L2の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドであるhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

- このような化合物には、(イ) FPR L1またはFPR L2を介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアミノ酸）、(ロ) FPR L1またはFPR L2を介する細胞刺激活性を阻害する化合物（いわゆる、本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアミノ酸）、(ハ) humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を減少させる化合物などが含まれる。

- 具体的には、本発明は、(i) 本発明のFPR L1またはFPR L2とhumanin類似ペプチドとを接触させた場合と(ii) 本発明のFPR L1またはFPR L2とhumanin類似ペプチドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と(ii) の場合における、

例えば、FPR L1またはFPR L2に対するhumanin類似ペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することとする。

- 細胞刺激活性としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などが挙げられるが、なかでも細胞内cAMP生成抑制活性が好ましい。

より具体的には、本発明は、

- a) 標識したhumanin類似ペプチドを、本発明のFPR L1またはFPR L2に接触させた場合と、標識したhumanin類似ペプチドおよび試験化合物を本発明のFPR L1またはFPR L2に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドの該FPR L1またはFPR L2に対する結合量を測定し、比較することとするhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- b) 標識したhumanin類似ペプチドを、本発明のFPR L1またはFPR L2を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したhumanin類似ペプチドおよび試験化合物を本発明のFPR L1またはFPR L2を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することとするhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- c) 標識したhumanin類似ペプチドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したFPR L1またはFPR L2に接触させた場合と、標識したhumanin類似ペプチドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のFPR L1またはFPR L2に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドの該FPR L1またはFPR L2に対する

る結合量を測定し、比較することを特徴とするhumanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 5 d) 本発明のF P R L 1またはF P R L 2を活性化する化合物またはその塩(例えば、humanin類似ペプチドなど)を本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞に接触させた場合における、F P R L 1またはF P R L 2を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするhumanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

- 10 e) 本発明のF P R L 1またはF P R L 2を活性化する化合物またはその塩(例えば、humanin類似ペプチドなど)を本発明のDNAを含有する形態転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のF P R L 1またはF P R L 2に接触させた場合と、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を本発明のDNAを含有する形態転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のF P R L 1またはF P R L 2に接触させた場合における、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするhumaninと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 20 さらに、リガンドとしては、humanin類似ペプチドに代えて、humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることもできる。このhumanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩は、例えば、リガンドとしてhumanin類似ペプチドを用いて、後述する本発明のスクリーニング方法を実施することによって得ることができる。以下のスクリーニング方法においては、humanin類似ペプチドとF P R L 1または

F P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩を含めて、単にhumanin類似ペプチドと表記する。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

- 5 まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のF P R L 1またはF P R L 2としては、上記した本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜成分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、相換え体を用いて大量発現させたヒト由来のF P R L 1またはF P R L 2などが適している。

- 10 本発明のF P R L 1またはF P R L 2を製造するには、上記の方法を用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のF P R L 1またはF P R L 2をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus; NPV)のガリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。

- 20 発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献(Numbi, P. ち、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年)に記載の方法に従って行なうことができる。

- 25 したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したF P R L 1またはF P R L 2であってよいし、該F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞を用いてもよく、また該F P R L 1またはF P R L 2を含

有する細胞の膜面分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞としては、該F P R L 1またはF P R L 2を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜面分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーキングアングルやリトロソ (Kinematic社製) のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速 (500 ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1 ~ 10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜面分とする。該膜面分中には、発現したF P R L 1またはF P R L 2と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

20 該F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞や膜面分中のF P R L 1またはF P R L 2の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

25 humanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする上記のa) ~ c) を実施するためには、例えば、適当なF P R L 1画分またはF P R L 2画分と、標識したhumanin類似ペプチドが必要である。

F P R L 1画分またはF P R L 2画分としては、天然型のF P R L 1画分ま

たはF P R L 2画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型F P R L 1画分またはF P R L 2画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

6 標識したhumanin類似ペプチドとしては、例えば( $^3\text{H}$ )、( $^{35}\text{S}$ )、( $^{14}\text{C}$ )、( $^{35}\text{S}$ )などで標識されたhumanin類似ペプチドなどが用いられる。

10 具体的には、humanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングを行なうには、まず本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞または細胞の膜面分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりF P R L 1標品またはF P R L 2標品を調製する。バッファーには、 $\text{pH}4 \sim 10$  (望ましくは $\text{pH}6 \sim 8$ ) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのhumaninとF P R L 1またはF P R L 2との結合を阻害しないバッファーであればよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup> (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやhumanin類似ペプチドの分解を抑える目的でPMSE、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ~ 10 mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000 ~ 50000 cpm) の標識したhumaninを添加し、同時に $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合 (NSB) を知るために大過剰の未標識のhumanin類似ペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0 ~ 50°C、望ましくは約4 ~ 37°Cで、約20分 ~ 24時間、望ましくは約30分 ~ 3時間行う。

25 反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンタまたはヤーカウンタで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント( $\text{B}_0$ )から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ( $\text{B}_0 - \text{NSB}$ ) を100%とした時、特異的結合量 ( $\text{B} - \text{NSB}$ ) が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻

産能力のある候補物質として選択することができる。

- humanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする上記のd)～e)の方法を実施するためには、例えば、F P R L 1またはF P R L 2を介する細胞刺激活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

- 具体的には、まず、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞をワルチウエルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、cAMP、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォールスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なF P R L 1またはF P R L 2を発現した細胞が必要である。本発明のF P R L 1またはF P R L 2を発現した細胞としては、天然型の本発明のF P R L 1またはF P R L 2を有する細胞株、上記の組換え型F P R L 1またはF P R L 2を発現した細胞株などが望ましい。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との

塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）の塩などが用いられる。

- また、試験化合物としては、F P R L 1またはF P R L 2の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。F P R L 1またはF P R L 2の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

- humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩がアミノトカアノグロニストであるかは、「humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩をF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞に接触させた場合における、F P R L 1またはF P R L 2を介した細胞内cAMP生成抑制活性を測定すること」を特徴とするF P R L 1またはF P R L 2に対するアミノストの決定方法」を用いて確認することができる。

- 具体的には、F P R L 1またはF P R L 2に対するアミノスト決定方法は、本発明の組換え型F P R L 1またはF P R L 2の発現系を構築し、該発現系を用いたリセプター結合アッセイ系を用いることによって、F P R L 1またはF P R L 2を介する細胞内cAMP生成抑制活性を有する化合物またはその塩を決定する方法である。

より具体的には、

- (1) humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩をF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞に接触させた場合における細胞内cAMP生成抑制活性を測定すること」を特徴とするF P R L 1またはF P R L 2に対するアミノストの決定方法、および
- (2) humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩をF P R L 1 DNAまたはF P R L 2 DNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したF P R L 1またはF P R L 2に接触させた場合におけるF P R L 1またはF P R L 2を介



する細胞内cAMP生成抑制活性を測定することを特徴とするF P R L 1またはF P R L 2に対するアゾニストの決定方法である。

このアゾニスト決定方法において、F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリオンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞の膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリソグアレンダーやポリトロソ (Kinematic社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の画分には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500~3000rpm) で短時間 (通常、約1~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したF P R L 1またはF P R L 2と細胞由来のリソ脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞やその細胞膜画分中のF P R L 1またはF P R L 2の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のアゾニスト決定方法を実施するためには、F P R L 1またはF P R L 2を介する細胞内cAMP生成抑制活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞をマルチウエルプレート等に培養する。アゾニスト決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適

当なベンゾアレーンに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、cAMPなどの生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい)。

このアゾニスト決定方法を用いることによって、細胞内cAMP生成抑制活性を示す化合物をF P R L 1またはF P R L 2に対するアゾニストとして、細胞内cAMP生成抑制活性を示さない化合物をF P R L 1またはF P R L 2に対するアゾニストとして選択することができる。

humanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のF P R L 1またはF P R L 2、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞、または本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

a) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 $\mu$ mのフィルターで滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調整してもよい。

b) F P R L 1標品またはF P R L 2標品

本発明のF P R L 1またはF P R L 2を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^4$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

c) 標識humanin類似ペプチド

市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S] などで標識したhumanin類似ペプチド

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝

液にて1 $\mu$ Mに希釈する。

d) humanin類似ペプチド標液

humanin類似ペプチドを0.1%ツシ血精アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

## 2. 測定法

a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のFPR L1またはFPR L2発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

b) 10<sup>-3</sup>~10<sup>-10</sup>Mの試験化合物溶液を5 $\mu$ l加えた後、標識humaninを5 $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに10<sup>-3</sup>Mのhumanin類似ペプチドを5 $\mu$ l加えておく。

c) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識humanin類似ペプチドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

d) 液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる作用を有する化合物またはその塩であり、具体的には、(イ) 本発明のFPR L1またはFPR L2を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(いわゆる、本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアゴニスト)、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物またはその塩(いわゆる、本発明のFPR L1またはFPR

L2に対するアンタゴニスト)、(ハ) humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を増強する化合物またはその塩、または(ニ) humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を減少させる化合物またはその塩である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよい、公知の化合物であってもよい。

該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ペンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアゴニストは、humanin類似ペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、humanin類似ペプチドが有する生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアンタゴニストは、humanin類似ペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、humanin類似ペプチドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を増強する化合物またはその塩は、humanin類似ペプチドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を減少させる化合物またはその塩は、humanin類似ペプチドが有する生理活性を減少させるためのhumanin類似ペプチドの生理活性を抑制

するための安全で低毒性な医薬として有用である。

具体的には、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるアゴニストまたはhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を増強する化合物またはその塩は、例えば、細胞死抑制剤として、さらには、例えば神経変性を伴う疾病など、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウソン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトヤコフ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、脳機能障害（例、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫、硬膜下血腫など）、癌（例、星状細胞腫、乏枝神経膠腫など）、免疫疾患、感染症（例、髄膜炎、原虫感染症、リケッチア感染症、後生動物感染症、Borna病などの細菌性またはウイルス性髄膜炎、ワクチン接種後脳炎、AIDS脳症など）、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患等の種々の疾病の予防・治療剤、好ましくは神経変性疾患、脳機能障害の予防・治療剤として、さらに好ましくはアルツハイマー病の予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。

一方、上記スクリーニング方法で得られるアゴニストまたはhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を減少させる化合物またはその塩は、本発明のFPR L1またはFPR L2の発現過多に起因する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

さらに、上記スクリーニング方法で得られるアゴニストのうち、 $\beta$ -アミロイド（1-42）とFPR L1との結合を阻害するものは、例えば、細胞死抑制剤として、さらには、例えば神経変性を伴う疾病など、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウソン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトヤコフ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、脳機能障害（例、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫、硬膜下血腫など）、癌（

例、星状細胞腫、乏枝神経膠腫など）、免疫疾患、感染症（例、髄膜炎、原虫感染症、リケッチア感染症、後生動物感染症、Borna病などの細菌性またはウイルス性髄膜炎、ワクチン接種後脳炎、AIDS脳症など）、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患等の種々の疾病の予防・治療剤、好ましくは神経変性疾患、脳機能障害の予防・治療剤として、さらに好ましくはアルツハイマー病の予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物またはその塩は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液利などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ペシクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用薬形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-ソルニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、

例えば、アルコール (例、エタノール)、ポリアルコール (例、フロビレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤 (例、ポリソルベート 80™、HCO-50) などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤 (例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸フロカインなど)、安定剤 (例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤 (例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ウタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、アルツハイマー病患者 (体重 60 kg として) においては、一日につき F P R L1 または F P R L2 に対するアミノ酸を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、アルツハイマー病患者 (体重 60 kg として) においては、一日につき F P R L1 または F P R L2 に対するアミノ酸を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用語号に基づくものであり、その例を下記する。ま

たアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアニン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: シスチニン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン

Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
PGlu	: ピログルタミン酸
*	: 終止コドンに対応する
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアノリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で採用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表配する。

Tos	: p-トルエンサルファニル
CHO	: ホルミル
Bzl	: ベンジル
Cl <sub>2</sub> Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブトキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェニル
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル

Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキシ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
Pbf	: 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラネン-5-スルホン
tBu	: 第3ブチル
TFA	: トリフルオロ酢酸
HOAt	: 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール
PyAop	: 7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス ピロリジノホスホニウム ヘキサフルオロホスファイト
DIPCDI	: 1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド
Fmoc-Leu-Ser (Psi (Me, Me) pro)-OH : (4S)-3-(Fmoc-Leu)-2, 2'-ジメチルオキサソリジン-4-カルボキシル酸 [(4S)-3-(Fmoc-Leu)-2, 2-dimethylloxazolidine-4-carboxylic acid]]	

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号: 1]  
ヒト由来FPR L1のアミノ酸配列を示す。

[配列番号: 2]  
ヒト由来FPR L1をコードするcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号: 3]  
参考例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号: 4]  
参考例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号: 5]  
参考例1で得られたhuman in類似ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

参考例1で得られたhumanin類似ペプチド(HN3)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

5 参考例1で用いられたクエリーの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

参考例1で得られた配列番号：7を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

10 参考例1で得られたhumanin類似ペプチドNH3 (配列番号：6)の部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：10〕

配列番号：9をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

ヒト型humanin (1-24) のアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号：12〕

〔Gly<sup>1</sup>〕-ヒト型humanin (1-24) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：13〕

ヒト型humanin (1-21) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕

20 ラット型humanin (1-38) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

ラット型humanin (1-24) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

ラット型humanin (1-21) のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：17〕

ラット由来FPR L1のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

ラット由来FPR L1をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

マウス由来FPR L2 (FPR L1) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

マウス由来FPR L2 (FPR L1) をコードするcDNAの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：21〕

ヒト由来FPR L2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

ヒト由来FPR L2をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

10 参考例5で用いたグライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

参考例5で用いたグライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

参考例6で用いたグライマー3の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：26〕

参考例6で用いたグライマー4の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

参考例6で用いたグライマー5の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

20 参考例6で用いたグライマー6の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

参考例6で用いたグライマー7の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

参考例6で用いたグライマー8の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：31〕

W-P e p t i d eのアミノ酸配列を示す。

後述の参考例1で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/pcdNA-hn3 は、2001年7月19日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生

物寄託センターに受託番号 FERM B-7674として、2001年7月3日から日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）の財団法人発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16673として寄託されている。

後述の参考例6で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pUC18-rFRL1は2003年1月10日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM B-8274として寄託されている。

#### 10 実施例

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

#### 15 参考例1

配列番号：7で表されるとhumanin遺伝子コード領域をクエリーにしてGENBANKに対してデータベースサーチを行ったところ、アクセシオン番号AL356135の配列中にhumanin遺伝子のコード領域に対応した開始および終止コドンを含むhumanin遺伝子に類似した遺伝子領域が存在することが見出された。この遺伝子が実質に存在し、また転写されて機能していることを確認するため、ヒト全脳polyA RNA（クロンテック社）1.0 $\mu$ gを鋳型に、SuperScript reverse transcriptase（ギブコ BRL社）を用い、マニエールにしたがって、oligo (dT) プライマーを用いて逆転写を行ってcDNAを作成し、アクセシオン番号AL356135の配列中のhumanin類似配列のコード領域の5'上流および3'下流に相当する順に、TACCGTACCGTGCAAGTAGCATG（配列番号：3）、GTGGCGCTATTCGGTGTTGTCATTCG（配列番号：4）のプライマーを設定して20 $\mu$ lの液量でPCR反応を行った。組成は、cDNA調製液から10ng mRNA相当分を鋳型に両primer 0.5 $\mu$ M、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、dNTP 0.2mM、AmpliTaq Gold（ペーキンエルマー社）1/100 volume、10倍濃縮AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volume

で行った。反応は、95℃で10分保温した後、95℃15秒、67℃15秒、72℃15秒のサイクルを40回繰り返し、72℃で5分保温した。得られた反応液を用い、Eukaryotic TOP0 TA cloning kit（インビトロジェン社）を用いてプラスミドベクターpCDNA3.1/V5/His-TOPOへサブクローニングし、大腸菌TOP10へ導入した。生じた形質転換体からQIA prep8 mini prep（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit（ペーキンエルマー社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、検索で見出されたhumanin類似配列のコード領域（配列番号：5）を含む配列番号：8で表される塩基配列が得られたことから、この遺伝子がヒト全脳において発現していることが確認された。

この配列には、humanin類似配列のコード領域全長が含まれていたため、上記プラスミドで大腸菌TOP10を形質転換して、*Escherichia coli* TOP10/pCDNA-hn3を得た。

#### 15 参考例2

配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有するHumanin類似ペプチド（HN3）を以下の方法で製造した。

市販の2-chlorotriyl resin（Cit resin、1.33 mmol/g）にFmoc-Thr(tBu)-OHを導入したFmoc-Thr(tBu)-O-Cit resin（0.527 mmol/g）0.25 mmol分をペプチド合成機ABI 433Aの反応槽に入れ、Fmoc/DCC/HOBt法を用い、固相合成を行った。Fmocアミノ酸の側鎖保護基はArgにはPbf基、LysにBoc基、Asp、Thr、SerにtBu基、CysにTrt基を用いた。他のアミノ酸は側鎖無保護のものを用い、上記に示す配列の13位Thrまでペプチド鎖を伸長した。得られたFmoc-humanin類似ペプチド（13-24）-O-Cit resinにFmoc-Leu-Ser(Psi(Me, Me)pro)-OH（NOVA社製、製品番号05-20-1004）をDIPCDI/HOBtで導入した後、10位LeuからN末端側へ配列順にDCC/HOBtで導入し、目的の保護ペプチド樹脂を得た。

この樹脂100 mgをTFA、thioanisole、m-cresol、水、triisopropylsilane、ethanedithiol（80:5:5:5:2:5:2:5）の混合液（total 1.5 ml）で室温、1.5時間攪拌した後、反応溶液にエーテルを加え、白色粉末を析出させ遠心分離後、上清

を除く操作を3回繰り返した。残渣を水で抽出後、凍結乾燥し白色粉末を得た。得られた粗ベグチドをYMC Pack R&D-ODS-5-B S-5、120Åカラム(30 x 25mm)を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B: 78/22→68/32への直線型濃度勾配溶出(60分)を行ない、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末21.8 mgを得た。

ESI-MS: M<sup>+</sup> 2692.8 (理論値 2692.5)

HPLC溶出時間 10.5分

#### 溶出条件

カラム YMC AM 301 (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 80/20

～30/70→ 直線型濃度勾配溶出(25分)

流速 1.0ml/分

#### 参考例 3

humanin類似ベグチドによるラット副腎髄質由来褐色細胞腫細胞PC12hに対するグルタミン酸誘発細胞死抑制活性

15 コラーゲンコート済み96ウェルプレート(1WAKI)に10%フシ胎児血清および5%馬血清を含むDulbecco modified Eagle's medium (以下、DMEM)を培地としてPC12h細胞(大阪大学蛋白質研究所・畠中寛教授より供与、Hatanaka, H., Brain Research, 222巻、225-233頁、1981年)を2 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度でまいた。24時間後に100 μlの20 mM HEPES (pH 7.5)を含むDMEMに培地を交換し、同時に、各種濃度の実施例2で製造したhumanin類似ベグチド(配列番号: 4)および添加後の濃度が1 mMとなるようにグルタミン酸を添加した。72時間後に0.2% Tween20を含むphosphate buffered saline 100 μlを用いて細胞を溶解し、抽出液の乳酸脱水酵素(LDH)活性をLDH Cytotoxic Test WAKO (和光純薬)によって測定した。結果を図1に示す。

25 グルタミン酸処理72時間後において、humanin類似ベグチド無添加区の細胞生存率が34.0%であったのに対し、humanin類似ベグチドを1 μMまたは10 μM添加することにより、細胞生存率は、それぞれ59.3%または74.6%に上昇した。なお、細胞生存率は、グルタミン酸無添加区を100%としたときの比率によって表わす。

これより、humanin類似ベグチドにより、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫細胞PC12hのグルタミン酸誘発細胞死が抑制されることが明らかである。

#### 参考例 4

Humanin類似ベグチド(19-24) (配列番号: 9):

Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Thrの製造

6 Fmoc-Thr(tBu)-O-Clt resinを用い、目的配列の保護ベグチド樹脂を調製し、実施例2に記載のhumanin類似ベグチドの精製法と同様の方法により精製して白色粉末29 mgを得た。

ESI-MS: M<sup>+</sup> 756.5 (理論値 756.5)

10 HPLC溶出時間 10.2分

#### 溶出条件

カラム YMC AM 301 (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 80/20

～30/70→ 直線型濃度勾配溶出(25分)

15 流速 1.0ml/分

参考例 5 マウス脾臓由来FRL2をコードするcDNAのクローニングと発現ベクターの構築

マウス脾臓cDNA (Marathon-Ready™ cDNA: Clontech社)を鋳型として、マウスFRL2の配列情報(Accession #071180: NCBI)をもとに設計した2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 23) 及びプライマー2 (配列番号: 24)を用いてPCRを行なった。PCRにはPyrobest DNA polymerase (宝酒造)を用い、①98℃・1分の後、②98℃・10秒、55℃・30秒、72℃・60秒を35回の後、③72℃・2分の伸長反応を行なった。反応後、増幅産物を制限酵素SalI及びXbaIで切断した後、プラスミドベクターPAKKO-111Hに挿入して発現ベクターを構築した。その塩基配列を解析した結果、配列番号: 19で表されるアミノ酸配列からなるマウスFRL2をコードするcDNA配列(配列番号: 20)を得た。

25 参考例 6 ラット脾臓由来FRL1をコードするcDNAのクローニングと



その塩基配列の決定及び発現ベクターの構築

ラット脾臓mRNAからMarathon™ cDNA Amplification Kit (Clontech社) を用いてcDNAを合成し、その末端にアダプターを付加した。これを鋳型として、2個のプライマー、プライマー3 (配列番号: 25) 及びプライマー4 (配列番号: 26) を用いてPCRを行なった。PCRにはAdvantage 2 Polymerase mix (Clontech社) を使い、①96℃・1分、②96℃・10秒、72℃・2分を5回、③96℃・10秒、70℃・2分を5回、④96℃・10秒、68℃・2分を25回の後、⑤72℃・5分の伸長反応を行なった。反応後、増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社) の処方にしたがってプラスミドベクターpCR2.1 TOPO (Invitrogen社) に挿入し、これを大腸菌JM109 (宝酒造) に導入してクローニングした。個々のクローンの塩基配列を解析した結果、新規cDNAを共役型レセプター蛋白質の一部をコードするcDNA配列を得た。この配列情報をもとに2個のプライマー、プライマー5 (配列番号: 27) 及びプライマー6 (配列番号: 28) を設計し、上述のラット脾臓mRNAから合成したcDNAを鋳型としてMarathon™ cDNA Amplification Kit (Clontech社) の処方に従ってそれぞれ5'-RACE及び3'-RACEを行なった。PCRは上述のものと同様に行ない、反応後増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社) の処方にしたがってプラスミドベクターpCR2.1 TOPO (Invitrogen社) に挿入し、これを大腸菌JM109 (宝酒造) に導入してクローニングした。個々のクローンの塩基配列を解析した結果、新規cDNAを共役型レセプター蛋白質の一部をコードするcDNA配列を得た。これらの配列情報からさらに2個のプライマー、プライマー7 (配列番号: 29) 及びプライマー8 (配列番号: 30) を設計し、上述のラット脾臓mRNAから合成したcDNAを鋳型としてPCRを行なった。PCRにはPyrobest DNA polymerase (宝酒造) を使い、①98℃・1分の後、②98℃・10秒、55℃・30秒、72℃・60秒を35回の後、③72℃・2

分の伸長反応を行なった。反応後、増幅産物を制限酵素SalI及びXbaIで切断した後、プラスミドベクターpAKKO-111Hに挿入して発現ベクターを構築した。これを制限酵素SalI及びNheIで切断して挿入断片を切り出し、プラスミドベクターpUC119に挿入してこれらの塩基配列を解析した結果、配列番号: 17で表されるアミノ酸配列からなるラットの新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列 (配列番号: 18) を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列 (配列番号: 17) を含有する新規タンパク質をラットFPRRL1と命名した。また、このプラスミドを保持する形質転換体を、大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109/pUC119-rFPRRL1と命名した。

参考例7 ラット脾臓由来FPRRL1をコードするcDNAを含有するプラスミドの作製

参考例6で得られた発現ベクターを制限酵素SalI及びNheIで切断して挿入断片を切り出し、プラスミドベクターpUC18に挿入してこれらの塩基配列を解析した結果、参考例5と同様に配列番号: 17で表されるアミノ酸配列からなるラットの新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列 (配列番号: 18) であることが確認できた。また、このプラスミドを保持する形質転換体を、大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109/pUC18-rFPRRL1と命名した。

実施例1 FPRRL1-GFPを発現させたCHO細胞における、ホルスコンジ添加によって増加させた細胞内cAMP量のhumanin類似ペプチド (HN3) (配列番号: 6) による抑制

FPRRL1-GFPを発現させたCHO細胞をアッセイ用培地 (HBSSに0.1%ウシ血清アルブミン、および、0.2mM IBMXを添加したもの) にて洗浄した後、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で30分培養した。アッセイ用培地にて希釈した各濃度のHN3、およびフォルスコンジを1μMとなるように添加した。37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で30分培養した。培養上清を捨てて、cAMP screen kit (アライババイオシステムズ社) のプロトコルに従い、細胞内のcAMP量をプレートリーダー (ARVO xマルチラベ

ルカウンター、Wallac社)を用いて測定した。

その結果、ベクターのみを導入したCHO細胞(mock)に比べ(図3)、FPR L1-GFP遺伝子を導入したCHO細胞特異的に、ホルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量のHN3による用量依存的特異的な減少が検出された(図2)。

実施例2 エトFPR1発現CHO細胞(No. 14)、エトFPR L1発現CHO細胞(No. 8)、エトFPR L2発現CHO細胞(No. 17)、マウスFPR L2(No. 15)およびラットFPR L1発現CHO細胞(No. 15)における、ホルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量の各

10 アゴニストによる抑制

上記の受容体を発現させたCHO細胞をアッセイ用培地(HBSS (GibcoBRL)に0.1%ウシ血清アルブミン、および、0.2mM IBMXを添加したもの)にて洗浄した後、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で30分培養した。アッセイ用培地にて希釈した各濃度のhuman in類似ペプチド(HN3)、その後ホルスコリン1μMとなるように添加した。37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で30分培養した。培養上清を捨て、cAMP screen kit (アライドバイオシステムズ社)のプロトコールに従い、細胞内のcAMP量をプレートリーダー(ARVO s xマルチカルカウンター、Wallac社)を用いて測定した。ホルスコリン1μM添加した細胞におけるcAMPの産生量を100%とし、ホルスコリンを添加していない細胞のcAMP産生量を0%として、各アゴニストを添加したときのcAMP量を%表示した。cAMP産生量を50%阻害する濃度(EC<sub>50</sub>)を、logit-logプロットより算出した。結果、HN3はhFPR L1に対してのみでなく、hFPR L2に対しても強く反応すること、また、mFPR L2およびFPR L1に対しても反応することが分かった(図4)。

25

#### 産業上の利用可能性

本発明のFPR L1、FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩とhuman in類似ペプチドを用いることによって、human in類似ペプチドと本発明のFPR L1、FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩と

の結合性を変化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。

## 請求の範囲

1. (1) 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) humanin類似ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とhumanin類似ペプチドまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 2. humanin類似ペプチドが、

(1) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、または

(2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列中の連続する6〜20個のアミノ酸からなるペプチドまたはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

15 3. humanin類似ペプチドが、

(1) a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列、b) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1〜10個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列に1〜10個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1〜5個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはe) これらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩、または

(2) a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目〜24番目、第5番目〜24番目、第1番目〜20番目、第5番目〜20番目、第1番目〜21番目、もしくは第5番目〜21番目のアミノ酸配列、b) 該アミノ酸配列中の1〜6個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 該アミノ酸配列に1〜6個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 該アミノ酸配列中の1〜6個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、e) またはこれらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなり、アミノ酸の数が6〜20個

であるペプチド(ただし、配列番号：11または配列番号：12で表されるアミノ酸配列の第19番目〜24番目、第5番目〜24番目、第1番目〜20番目、第5番目〜20番目、第1番目〜21番目または第5番目〜21番目のアミノ酸配列からなるペプチドを除く) またはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

6 4. humanin類似ペプチドが、

(1) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩、または

(2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目〜24番目、第5番目〜24番目、第1番目〜20番目、第5番目〜20番目、第1番目〜21番目、もしくは第5番目〜21番目のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

15 5. (1) 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) humanin類似ペプチドを含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とhumanin類似ペプチドまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。

20 6. 請求項1記載のスクリーニング方法または請求項5記載のスクリーニングキットを用いて得られうる、humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩。

25 7. アゴニストである請求項6記載の化合物。

8. アンタゴニストである請求項6記載の化合物。

9. humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質

質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

10. 請求項7記載のアミノストを含有してなる神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療剤。

11. アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療剤である請求項10記載の予防・治療剤。

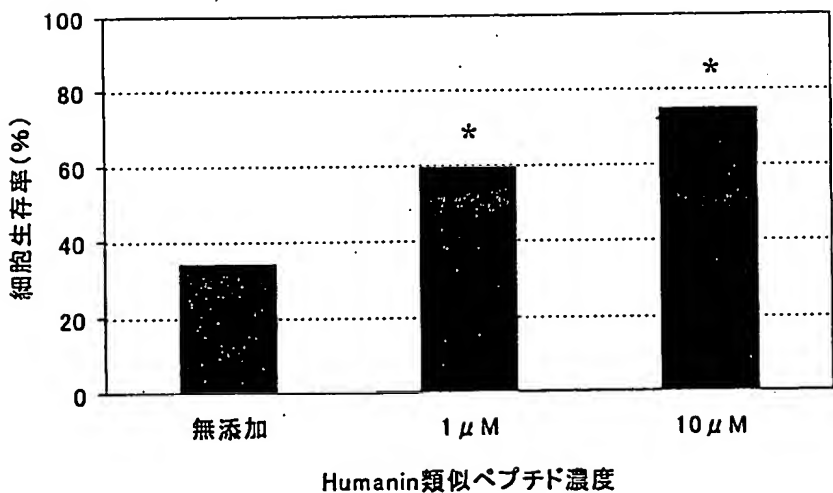
12. 請求項7記載のアミノストを含有してなる細胞死抑制剤。

13. (1) 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型セブター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) humanin類似ペプチドまたはその塩と該セブター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該セブター蛋白質またはその塩に対するアミノストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

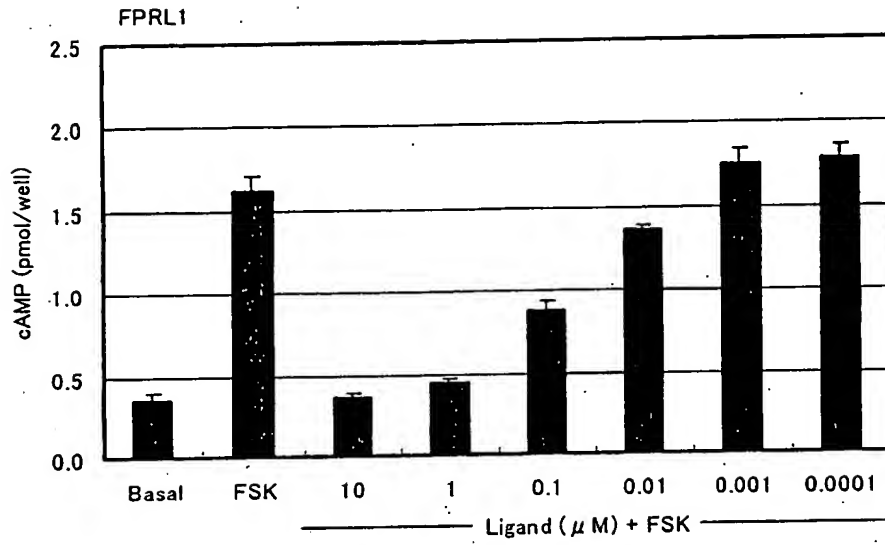
14. 哺乳動物に対して、請求項7記載のアミノストの有効量を投与することとを特徴とする(i)神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療方法、(ii)アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療方法または(iii)細胞死抑制方法。

15. (i)神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療剤、(ii)アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療剤または(iii)細胞死抑制剤を製造するための請求項7記載のアミノストの使用。

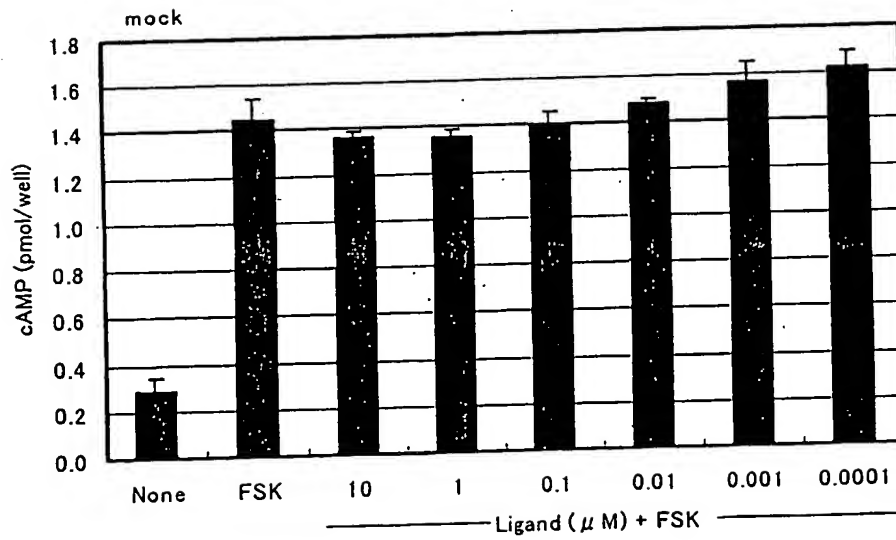
図 1



2



3



4/4

4

Sample	EC <sub>50</sub> Values (nM)		
	hFPRL1(No.14)	hFPRL1(No.8)	hFPRL2(No.17)
HN3	>10000	14	110
W-Peptide	0.14	0.027	>10000
$\beta$ -Amyloid(1-42)	>10000	1200	>10000

Sample	EC <sub>50</sub> Values (nM)	
	mFPRL2(No.15)	rFPRL1(No.15)
HN3	370	650
W-Peptide	0.063	0.12
$\beta$ -Amyloid(1-42)	170	>10000

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; Novel Screening Method

&lt;130&gt; 3072W00P

&lt;150&gt; JP 2002-205554

&lt;151&gt; 2002-07-15

&lt;160&gt; 31

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 351

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Met Glu Thr Asn Phe Ser Thr Pro Leu Asn Glu Tyr Glu Glu Val Ser

5 10 15

Tyr Glu Ser Ala Gly Tyr Thr Val Leu Arg Ile Leu Pro Leu Val Val

20 25 30

Leu Gly Val Thr Phe Val Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile

35 40 45

Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Thr Arg Thr Val Thr Thr Ile Cys Tyr

50 55 60

Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Ala Thr Leu Pro Phe

65 70 75 80

Leu Ile Val Ser Met Ala Met Gly Glu Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe

85 90 95

Leu Cys Lys Leu Ile His Ile Val Val Asp Ile Asn Leu Phe Gly Ser

100 105 110

Val Phe Leu Ile Gly Phe Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu

115 120 125

His Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Met Lys  
130 135 140  
Val Ile Val Gly Pro Trp Ile Leu Ala Leu Val Leu Thr Leu Pro Val  
145 150 155 160  
Phe Leu Phe Leu Thr Thr Val Thr Ile Pro Asn Gly Asp Thr Tyr Cys  
165 170 175  
Thr Phe Asn Phe Ala Ser Trp Gly Gly Thr Pro Glu Glu Arg Leu Lys  
180 185 190  
Val Ala Ile Thr Met Leu Thr Ala Arg Gly Ile Ile Arg Phe Val Ile  
195 200 205  
Gly Phe Ser Leu Pro Met Ser Ile Val Ala Ile Cys Tyr Gly Leu Ile  
210 215 220  
Ala Ala Lys Ile His Lys Lys Gly Met Ile Lys Ser Ser Arg Pro Leu  
225 230 235 240  
Arg Val Leu Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro  
245 250 255  
Phe Gln Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Val Trp Leu Lys Glu Met Leu  
260 265 270  
Phe Tyr Gly Lys Tyr Lys Ile Ile Asp Ile Leu Val Asn Pro Thr Ser  
275 280 285  
Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Val Phe  
290 295 300  
Val Gly Gln Asp Phe Arg Glu Arg Leu Ile His Ser Leu Pro Thr Ser  
305 310 315 320  
Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Ala Pro Thr Asn Asp Thr Ala  
325 330 335  
Ala Asn Ser Ala Ser Pro Pro Ala Glu Thr Glu Leu Gln Ala Met  
340 345 350

<210> 2  
<211> 1053  
<212> DNA  
<213> Human  
<400> 2  
atggaacaa actctccac tccctcgaat gaataagaag aagtgctcia tgaatcgtc 60  
ggctacactg ttctgcggat cctcccatcg gtgtgtgttg gggctaacct tgcctcggg 120  
gtcctgggca atgggccttgt gctcrrgggt gctggatccc ggaatgacag cacagtcacc 180  
accatcctgt acctgaacct gggccctggct gactttcct tcaaggccac attaccatc 240  
ctcatctgt ccatggccat gggagaanaaa tggcccttgg gctggctcct gtgaagta 300  
attacacatcg tggtagaact caacctctt ggaagtgtct tcttgatagg ttcatgca 360  
ctggaacgct gcaatttgtt cctgcaccca gtctggggccc agaaccaccc cactgtaggt 420  
ctggccatga aggtgacgt cggaccttgg attctgtc tagtcttacc ctggcaggt 480  
ttccctttt tgactacagt aactatcca aatgggaca catactgac ttcaactt 540  
gcatactgg gtgcacccc tgaagagagg ctgaagtgag ccaatcacat gctgacagcc 600  
agaaggatla tccggttgt catlgtcctt agcttggcga tgtccatagt tggcattcgc 660  
tatgggctca ttgacagcaa gattccacaa aagggcata ttaattccag ccgtccctta 720  
cgggtccctca ctgctgtgtt ggtctcttc ttcaatcgtt ggtttccct tcaactggt 780  
ggccttcctgg gcaaccgtcg gctcaagag atgttgtact atggcaagta caaatcatt 840  
gacatcctgg ttaaccacac gaggctccctg gcttcttca acagctgctt caaccctatg 900  
cttaccgtct ttgtgggcca agacttccga gagagactga tccatccctt gccaccagt 960  
ctggaagagg cctgtctga ggaactagcc ccaactaatg acacggctgc caattcgtct 1020  
tcacctctg cagagactga gttacagca atg 1053  
<210> 3  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 3

taccctaac gtccaaggt agcatg 26

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 4

gtggacctat tgggtgtgt ttgcattg 29

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

atggctcgac gaggttcag ctgtctctta ctltcaacca ctgcacatga cctggccgtg 60

aagaggcggc ca 72

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 6

Met Ala Arg Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Ser Thr Thr Ala Thr

1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Thr

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 7

atggctcac gaggttcag ctgtctctta ctltcaacca gtgaattga cctggccgtg 60

aagaggcggc cataa 75

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 145

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 8

atcacttgtt ccttaaatg ggaactgtat gaatgctcg acgaggttc agctgtctt 60

tacttcaac cactgcaact gacctggccg tgaagagcgc gcataatgc aacagagca 120

gaagaccata tggagcttca atta 145

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 9

Pro Val Lys Arg Arg Thr

1 5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 10

cccgtgaaga ggcggcca 18

&lt;210&gt; 11



<211> 24  
<212> PRT  
<213> Human  
<400> 11  
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile  
1 5 10 15  
Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala  
20 24  
<210> 12  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Human  
<400> 12  
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile  
1 5 10 15  
Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala  
20 24  
<210> 13  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Human  
<400> 13  
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile  
1 5 10 15  
Asp Leu Pro Val Lys  
20 21  
<210> 14  
<211> 38

<212> PRT  
<213> Rat  
<400> 14  
Met Ala Lys Arg Gly Phe Asn Cys Leu Leu Leu Ser Ile Ser Glu Ile  
5 10 15  
Asp Leu Pro Val Lys Arg Leu Glu Ser Pro Asn Lys Thr Arg Arg Pro  
20 25 30  
Tyr Gly Ala Ser Ile Tyr  
35 38  
<210> 15  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Rat  
<400> 15  
Met Ala Lys Arg Gly Phe Asn Cys Leu Leu Leu Ser Ile Ser Glu Ile  
5 10 15  
Asp Leu Pro Val Lys Arg Leu Glu  
20 24  
<210> 16  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Rat  
<400> 16  
Met Ala Lys Arg Gly Phe Asn Cys Leu Leu Leu Ser Ile Ser Glu Ile  
5 10 15  
Asp Leu Pro Val Lys  
20 21  
<210> 17

<211> 351  
 <212> PRT  
 <213> Rat  
 <400> 17  
 Met Glu Ala Asn Tyr Ser Ile Pro Leu Asn Val Ser Glu Val Val Val  
     5          10          15  
 Tyr Asp Ser Thr Ile Ser Arg Val Leu Trp Ile Leu Thr Met Val Val  
     20          25          30  
 Leu Ser Ile Thr Phe Val Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile  
     35          40          45  
 Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Val His Thr Val Thr Thr Cys Phe  
     50          55          60  
 Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Val Thr Leu Pro Phe  
     65          70          75          80  
 Phe Val Ile Ser Ile Ala Met Lys Glu Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe  
     85          90          95  
 Leu Cys Lys Leu Val His Ile Val Val Asp Ile Asn Leu Phe Gly Ser  
     100         105         110  
 Val Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu  
     115         120         125  
 His Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Arg Lys  
     130         135         140  
 Val Val Val Gly Pro Trp Ile Leu Ala Leu Ile Leu Thr Leu Pro Ile  
     145         150         155         160  
 Phe Ile Phe Met Thr Thr Val Arg Ile Pro Gly Gly Asn Val Tyr Cys  
     165         170         175  
 Thr Phe Asn Phe Ala Ser Trp Gly Asn Thr Ala Glu Glu Leu Leu Asn  
     180         185         190

Ile Ala Asn Thr Phe Val Thr Val Arg Gly Ser Ile Arg Phe Ile Ile  
     195          200          205  
 Gly Phe Ile Met Pro Met Ser Ile Val Ala Ile Cys Tyr Gly Leu Ile  
     210          215          220  
 Ala Val Lys Ile His Arg Arg Ala Leu Val Asn Ser Ser Arg Pro Leu  
     225          230          235          240  
 Arg Val Leu Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro  
     245          250          255  
 Phe Gln Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Ile Trp Phe Lys Glu Ser Leu  
     260          265          270  
 Phe Ser Gly Arg Tyr Lys Ile Leu Asp Met Trp Val His Pro Thr Ser  
     275          280          285  
 Ser Leu Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Ala Phe  
     290          295          300  
 Met Gly Gln Asp Phe His Glu Arg Leu Ile His Ser Leu Pro Ser Ser  
     305          310          315          320  
 Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Gly Gln Thr Ser Asp Thr Gly  
     325          330          335  
 Ile Ser Ser Ala Leu Pro Pro Val Asn Ile Asp Ile Lys Ala Ile  
     340          345          350  
 <210> 18  
 <211> 1053  
 <212> DNA  
 <213> Rat  
 <400> 18  
 atggaagca actatccat ccctctgaat gatacagaag tggttgtcia tgatttacc 60  
 atccagag ttltgtggat cctcacaaatg gtgtgttctct ccatcaccit tgtcctgggt 120  
 gtctgggta atggactagt gatctgggta gctggattcc ggaagtacaa cactgtacc 180

actacatgtttctgaatc agcttggct gacttcttccacagttacacatc 240  
 ttgttcatctcaattgtat gaaagaaaa tggcttttg gattgttctgtgtaaata 300  
 gtacacattgtagtagcat aaaccttt ggaagtgttccgtattgc tttaattgc 360  
 ttggaccgt gcatlttgtt cctgaccca gtctggctc agaaccaccg cacttgagc 420  
 ctggctagga aggttggtt tgggcccgtg atttagctc tgaattcac ttggccatt 480  
 ttatttcca tgcctacagt tagaattcct ggaaggcaatg tgtactgtac attcaattc 540  
 gcacccctggg gtacacatgc tgaagaaacta ttgaacatac ctacacctt tgaacagt 600  
 agaggagga tcaagttcat taaggcttc ataatgaccta tgcacattgt tgcacatgc 660  
 taaggacctc tccgtgtcaa gattccacaga agagccattg ttatctcag ccgtccatt 720  
 agagttccta cagcagttgt ggccttccctc ttatctgtt ggtttccctt tcaactgggtg 780  
 gcccttttg gtacacatctg gtttaagag tcatgttta gtggctgtta caaatctt 840  
 gacatgtggg ttacccaac cagctcattg gcctactca atagtgtcct caatcaatg 900  
 ctctatgctt tcatgggcca ggaatttcat gaaagactga ttcatctcct gcccttcagt 960  
 ctggagagag cccttgatga ggaacttggc caaacacagt atacagcatc cagttctgtc 1020  
 ttactctctg taacattga tataaagca ata 1053

<210> 19  
 <211> 351  
 <212> PRT  
 <213> Mouse  
 <400> 19  
 Met Glu Ser Asn Tyr Ser Ile His Leu Asn Gly Ser Glu Val Val Val  
 5 10 15  
 Tyr Asp Ser Thr Ile Ser Arg Val Leu Trp Ile Leu Ser Met Val Val  
 20 25 30  
 Val Ser Ile Thr Phe Phe Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile  
 35 40 45  
 Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Pro His Thr Val Thr Thr Ile Trp Tyr  
 50 55 60

Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Ala Thr Leu Pro Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Val Glu Met Ala Met Lys Glu Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe  
 85 90 95  
 Leu Cys Lys Leu Val His Ile Val Val Asp Val Asn Leu Phe Gly Ser  
 100 105 110  
 Val Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu  
 115 120 125  
 His Pro Val Trp Ala Glu Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Arg Lys  
 130 135 140  
 Val Val Val Gly Pro Trp Ile Phe Ala Leu Ile Leu Thr Leu Pro Ile  
 145 150 155 160  
 Phe Ile Phe Leu Thr Thr Val Arg Ile Pro Gly Gly Asp Val Tyr Cys  
 165 170 175  
 Thr Phe Asn Phe Gly Ser Trp Ala Glu Thr Asp Glu Glu Lys Leu Asn  
 180 185 190  
 Thr Ala Ile Thr Phe Val Thr Thr Arg Gly Ile Ile Arg Phe Leu Ile  
 195 200 205  
 Gly Phe Ser Met Pro Met Ser Ile Val Ala Val Cys Tyr Gly Leu Ile  
 210 215 220  
 Ala Val Lys Ile Asn Arg Arg Asn Leu Val Asn Ser Ser Arg Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Arg Val Leu Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro  
 245 250 255  
 Phe Glu Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Val Trp Phe Lys Glu Thr Leu  
 260 265 270  
 Leu Ser Gly Ser Tyr Lys Ile Leu Asp Met Phe Val Asn Pro Thr Ser  
 275 280 285

Ser Leu Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Val Phe

290 295 300

Met Gly Gln Asp Phe Arg Glu Arg Phe Ile His Ser Leu Pro Tyr Ser

305 310 315 320

Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Gly Gln Thr Ser Asp Ser Ser

325 330 335

Thr Ser Ser Thr Ser Pro Pro Ala Asp Ile Glu Leu Lys Ala Pro

340 345 350

<210> 20

<211> 1053

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 20

atgaatacca actatccat ccatctgaat ggaatcagaag tgggtgtta tgattctac 60  
atccagag ttctgtggat cctcctaatg gtggttgtct ccatcattt ctctctgggt 120  
gtgtgggga atgaactagt gatttggga gctggatcc ggaatgcaca caatgcacc 180  
actatcgt atctgaact agcatggct gactttcct tcacagcaac tctaccatc 240  
ctctctgt aatggctat gaaagaaaa tggccttgg gctgttctc gtgaattta 300  
gtcaaatg tggtagatgt aaacctgtt ggaagtgtc tcttgatgc tctcatggc 360  
ttggaccgt gcaatttgt tctgacacca gtctgggtc agaaccacg caatgtgagc 420  
ctggtagga aggtgtgtt tgggcccctg attttgctc tgattctcac ttggccatt 480  
tttatctct tgaactcgt tagaatcct ggaaggatg tgtattgtac attcaattt 540  
ggaatcctgg ctcaaatga tgaagaaaag ttgaacacg ctatcaattt tgaacaact 600  
agaaggatca tcaagttcct taatgttcc agcatgccca tgcatttgt tgcgtttgc 660  
tatgaactca ttgtgtcga gatcaacaga agaaacttg ttaattccag ccgtcttta 720  
cgagttcta cagcagttgt ggtctccttc ttatctgct ggttccctt tcagcttgg 780  
gacctttgg gcaacgtct gttaaaag acattgcta gtgttagtta taaattcct 840  
gacatgttg ttaaccacaa aagctcatg gcttactca atagtgtc caatcagatg 900

ctctatgttt tcaaggcca ggaattcgt gagaattta ttaattcct gcctatagt 960  
ctgagagag ccctggatga ggaattcgt caaacagatg attcaagcac caatttact 1020  
tcacctcctg cagacattga gttaaaggcc cca 1053

<210> 21

<211> 353

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Met Glu Thr Asn Phe Ser Ile Pro Leu Asn Glu Thr Glu Glu Val Leu

5 10 15

Pro Glu Pro Ala Gly His Thr Val Leu Trp Ile Phe Ser Leu Leu Val

20 25 30

His Gly Val Thr Phe Val Phe Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile

35 40 45

Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Thr Arg Thr Val Asn Thr Ile Cys Tyr

50 55 60

Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Ser Ala Ile Leu Pro Phe

65 70 75 80

Arg Met Val Ser Val Ala Met Arg Glu Lys Trp Pro Phe Ala Ser Phe

85 90 95

Leu Cys Lys Leu Val His Val Met Ile Asp Ile Asn Leu Phe Val Ser

100 105 110

Val Tyr Leu Ile Thr Ile Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu

115 120 125

His Pro Ala Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Met Ser Leu Ala Lys Arg

130 135 140

Val Met Thr Gly Leu Trp Ile Phe Thr Ile Val Leu Thr Leu Pro Asn

145 150 155 160

Phe Ile Phe Trp Thr Thr Ile Ser Thr Thr Asn Gly Asp Thr Tyr Cys  
 165 170 175  
 Ile Phe Asn Phe Ala Phe Trp Gly Asp Thr Ala Val Glu Arg Leu Asn  
 180 185 190  
 Val Phe Ile Thr Met Ala Lys Val Phe Leu Ile Leu His Phe Ile Ile  
 195 200 205  
 Gly Phe Thr Val Pro Met Ser Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Ile Ile  
 210 215 220  
 Ala Ala Lys Ile His Arg Asn His Met Ile Lys Ser Ser Arg Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Arg Val Phe Ala Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro  
 245 250 255  
 Tyr Glu Leu Ile Gly Ile Leu Met Ala Val Trp Leu Lys Glu Met Leu  
 260 265 270  
 Leu Asn Gly Lys Tyr Lys Ile Ile Leu Val Leu Ile Asn Pro Thr Ser  
 275 280 285  
 Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Val Phe  
 290 295 300  
 Met Gly Arg Asn Phe Gln Glu Arg Leu Ile Arg Ser Leu Pro Thr Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Glu Arg Ala Leu Thr Glu Val Pro Asp Ser Ala Gln Thr Ser Asn  
 325 330 335  
 Thr His Thr Thr Ser Ala Ser Pro Pro Glu Glu Thr Glu Leu Gln Ala  
 340 345 350  
 Met  
 <210> 22  
 <211> 1059  
 <212> DNA

<213> Human  
 <400> 22  
 atggaacca acttctcat tccttgaat gaacatgagg aggtgtccc tgaactgct 60  
 gccacaccg ttcttggat ctctcatatg ctatgcacg gattcaact tgtctcggg 120  
 gtcttgsgca atggcttgt gatcgggtg gcctgattcc gcatgacag cacagtcac 180  
 accatctgt acctgaacct ggccttagct gactctct tcagtgcat cctaccattc 240  
 cgaatgct cagtcacat gaggagaana tggcttttg cgtatctct atgtaatga 300  
 gtcatgta tgaatagcat caactggtt gtcaagtct acctatcac catcatgct 360  
 ctggaccgt gtaatttgt ctgtatcca gcctggggcc agaaccatcg caecatgagt 420  
 ctggccaaga gggatgagc gggactcttg atttcacca tagtctctac cttaaccaat 480  
 ttcatctct ggaactaat aagtactagc aatggggaca catactgat ttcaactt 540  
 gcatctggg gtgacactg tgaagagg ttgaactgt tcaatcac ggcgaagtc 600  
 ttctgatcc tcaacticat tatggctc acgttgctta tgcatacat caacgtctc 660  
 tatggatca tgcctgcca aatcacaga aaccacatga ttaatccag ccgtccctta 720  
 cgtgtcttg ctgctgtgt gctctcttc ttcatctgt gttccctta tgaactaat 780  
 ggcattctaa tggcagctg gctcaagag atgttgtta atggcaata caaatcatt 840  
 ctgtctctga ttaaccacac aagctcttg gccttttla acagctgct caaccat 900  
 ctctagctt ttatgggtg taacttcaa gaagactga ttgccttt gccactagt 960  
 ttggagagg ccctgactga ggtccctgac tcagccaga ccagcaaac acacacct 1020  
 tctgctcac ctctgaggga gacggagta caagcatg 1059  
 <210> 23  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 23  
 aacagctcga caacatgga atcaactac tcatcattc tg 42

<210> 24  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 24  
cttcttagat catggggcct ttaacctaat gtc 33  
<210> 25  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 25  
atctggatag ctggatctcg gatg 24  
<210> 26  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 26  
tctttcatga aagtcctggc ccatgaa 27  
<210> 27  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer  
<400> 27  
aggaattcta actgtagtca tga 24  
<210> 28  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 28  
acagtagag gtagcatcag gtc 24  
<210> 29  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 29  
ataaagtcga ccaccatgga agccaactat tccatccctc tga 43  
<210> 30  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 30  
aaatctagat catatgctt ttatatcaat gttaca 37

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/07501A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int. Cl. G01N33/53, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int. Cl. G01N33/50-98, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 Jitsuyo Shunan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shunan Koho 1994-2003  
 Kokei Jitsuyo Shunan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shunan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	G. G. YING, et al., "HUMANIN, A NEWLY IDENTIFIED NEUROPROTECTIVE FACTOR, USES THE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR (PPRI) AS A FUNCTIONAL RECEPTOR" JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH VOL. 22, SUPPLEMENT 1, (OCTOBER 2002), P. S-180	1-5, 13
P, A	WO 02/103018 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 27 December, 2002 (27.12.02), (Family: none)	1-5, 13
A	WO 01/21787 A (Keio University), 29 March, 2001 (29.03.01), & EP 1221480 A	1-5, 13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "X" document defining the general state of the art which is not  
 considered to be of particular relevance  
 "Y" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is  
 cited to establish the publication date of another citation or other  
 special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
 means  
 "P" document published prior to the international filing date but later  
 than the priority date claimed  
 "T" later document published after the international filing date or  
 priority date and not cited in the application but cited to  
 establish the state of the art or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
 step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
 considered to involve an inventive step when the document is  
 combined with one or more other such documents, such  
 combination being obvious to a person skilled in the art  
 "O" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 JULY, 2003 (08.07.03)

Date of mailing of the international search report  
29 JULY, 2003 (29.07.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07501

Box I Observations where certain claims were found unsearchable(Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos. 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 14 pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1 (iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos. 6-12, 15

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(see extra sheet)

☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international searching authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07501

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

The above claims present no specific constitution as a compound or its salt capable of changing the binding properties or signal transduction of a G protein-coupled receptor protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, 17, 19 or 21 or its salt to a humanin-like peptide or its salt. No specific constitution thereof is stated in the description too.

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/07501

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/53, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った能力検査材料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/50-58, G01N33/15

従小検査材料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国特許実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案特許公報	1996-2003年

調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用紙)  
OSIS (DIALOC), WP1 (DIALOC)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	G. G. YING, et al. "HUMANIN, A NEWLY IDENTIFIED NEUROPROTECTIVE FACTOR, USES THE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR PRL1 AS A FUNCTIONAL RECEPTOR" JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH VOL. 22, SUPPLEMENT 1, (OCTOBER 2002) P. S-180	1-5, 13
PA	WO 02/103018 A (武田薬品工業株式会社) 2002.12.27 (フタミリーなし)	1-5, 13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントフタミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Y」 優先権主張に該特許を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、開示等に及ぼす文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントフタミリー文献

国際調査を完了した日 08.07.03

国際調査報告の発送日 29.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J/P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (情報のある職員)  
山村 祥子

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/07501

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 01/21787 A (学校法人慶應義塾) 2001.03.29 &EP 1221480 A	1-5, 13

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の段)  
出願8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、請求の範囲14は、人の身体の手術又は治療による処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 6-12, 15 は、有意義な国際調査をすることができ得る程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、特別ページ参照。

☐ 請求の範囲 請求の範囲 6-12, 15 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第1欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の段)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

- ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
- ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの段 (1)) (1998年7月)

上記請求の範囲には、humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号1, 17, 19, 21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩としての具体的な構成は何ら記載されていない。また、明細書内の記載においても具体的な構成は何ら明記されていない。